



Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée.

/ Filosa Lugdivine

► To cite this version:

| / Filosa Lugdivine. Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des
| patients de l'EFS Alpes Méditerranée.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. hal-01690364

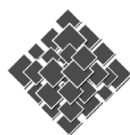
HAL Id: hal-01690364

<https://ephe.hal.science/hal-01690364>

Submitted on 29 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par
DE BOISGROLLIER/FILOSA Lugdivine

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée.

Soutenu le 01/12/2017

devant le jury suivant :

- Mme BLUTEAU Dominique – **Président**
- Mme SILVY Monique – **Tuteur scientifique**
- Mme GARDIE Betty – **Tuteur pédagogique**
- Mr PEYRARD Thierry – **Rapporteur**
- Mr CHIARONI Jacques – **Examineur**
- Mr BRES Jean-Charles – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme SILVY Monique – Tuteur Scientifique

Intitulé de la structure d'accueil : *Biologie des Groupes Sanguins, UMR7268 ADES, AMU/EFS/CNRS Faculté de Médecine Timone 4^{ème} étage aile Rouge, 27 bd Jean Moulin 13005 Marseille*

Directeur : *Mr BAILLY Pascal*

et de

Mme GARDIE Betty – Tuteur pédagogique

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, 8 quai Moncousu-BP 70721-44007 Nantes Cedex 1

Directeur : *Mr Grégoire Marc*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Génome, Cancers et Thérapie (GCT)

REMERCIEMENTS

A l'issue de ces trois années dédiées à l'obtention de ce diplôme de l'EPHE je tiens à remercier toutes les personnes qui se sont impliquées et investies avec moi dans ce travail. Je souhaite donc témoigner ma reconnaissance et ma gratitude aux personnes qui ont rendu cela possible.

Tout d'abord je souhaite remercier mon directeur de laboratoire Pascal BAILLY. Merci d'avoir cru en moi et proposé cette formation. Merci de m'avoir soutenue et de m'avoir aidée pour la rédaction du mémoire.

Je remercie également Jacques CHIARONI, directeur de l'EFS-AM d'avoir validé et accepté le financement de l'intégralité de cette formation.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma tutrice scientifique, Monique SILVY qui s'est investie intégralement tout au long de ce parcours. Son savoir, sa patience, sa grande disponibilité ont été des atouts majeurs pour cette formation. Merci de ne m'avoir jamais laissée tomber durant ces trois années. C'est grâce à Monique SILVY que j'ai pu mener à terme ce projet.

Je remercie aussi ma tutrice pédagogique, Betty GARDIE, qui s'est régulièrement intéressée à mon travail, et à toujours été très réactive lors de mes demandes. En plus de conseils scientifiques, ses corrections ont été très utiles et ont apportées une vision neuve à mon mémoire.

J'exprime ma reconnaissance à Mme Dominique BLUTEAU qui me fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je souhaite aussi remercier Thierry PEYRARD pour avoir accepté la fonction de rapporteur ainsi que Jean-Charles BRES pour avoir accepté celle d'examineur.

Enfin, je remercie tous mes collègues de travail qui m'ont apporté une grande aide dans la réalisation de mes techniques et qui m'ont laissé du temps pour la rédaction de mon mémoire. Je tiens aussi à remercier les biologistes de l'EFS-AM plus particulièrement Elisabeth DURIEUX-ROUSSEL, Laurine LAGET et Caroline IZARD pour m'avoir soutenu dans ce projet.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
TABLE DES TABLEAUX	6
TABLE DES FIGURES.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
I. INTRODUCTION.....	10
1. Les antigènes de groupe sanguin.....	11
A. Définition, classification	11
B. Phénotype érythrocytaire rare	14
a. Absence d'expression.....	14
b. Expression d'antigènes rares.....	15
c. Gestion des phénotypes érythrocytaires rares	15
2. Le système RH (ISBT 004).....	16
A. Les bases moléculaires du système RH.....	17
B. Le complexe RH et sa fonction	18
C. Bases moléculaires du phénotype RhD-positif / RhD-négatif	19
D. Bases moléculaires du phénotype Rhc/RhC et Rhe/RhE.....	20
E. Bases moléculaires des variants RhD faibles et partiels.	21
F. Bases moléculaires des variants RhCE faibles et partiels.	23
G. Haplotype RHD / CE source de complexité	24
H. Le phénotype Rh _{nul} et D-/-	24
I. Alloimmunisation anti-RH et sa gestion	25
J. Les anticorps anti-Rh	25
3. Le système de groupe sanguins KEL (ISBT 006)	26
A. Le gène et la protéine Kell.....	26
B. Les antigènes du système KEL	27
a. Les antigènes KEL1 (K) et KEL2 (k)	27
b. Les antigènes KEL3 (Kp ^a), KEL4 (Kp ^b) et KEL21 (Kp ^c)	28
c. Les antigènes KEL6 (Js ^a), KEL7 (Js ^b).....	28
C. Phénotypes McLeod, K _{mod} et Kell _{nul}	29
D. Les anticorps anti-Kell	30
4. Antigènes de faible et haute fréquence : les systèmes Cartwright et Vel	30
A. Système Cartwright : YT (ISBT 011)	30
a. Le gène et la protéine	30
b. Antigènes et anticorps	32
B. Système Vel (ISBT 034).....	33

a.	Protéine et bases moléculaires.....	33
b.	Antigène et phénotypes Vel-négatif et Vel faible.....	33
c.	Anticorps.....	34
II.	OBJECTIFS	35
III.	MATERIELS ET METHODES.....	37
1.	Extraction d'ADN.....	37
2.	Génotypage BioArray.....	37
3.	Amplification et séquençage du gène <i>RHD</i> , <i>RHCE</i> et <i>KEL</i>	40
4.	Discrimination allélique utilisant des sondes d'hydrolyse (Technique TaqMan)	40
A.	Détection de <i>RHCE*RN</i>	41
B.	Détection des allèles responsables de phénotype prédit Vel+ et Vel-.....	41
5.	Détection des allèles <i>YT*01</i> et <i>YT*02</i> par PCR allèle spécifique.....	42
6.	Cytométrie en flux	43
7.	Détermination du phénotype RH.	44
IV.	RESULTATS	45
1.	Etude moléculaire des patients présentant une ambiguïté phénotypique au sein du système RH.....	45
A.	Ambiguïté du phénotype RhD et détection des variants	45
a.	Technique de première intention : Bioarray RHD.....	45
b.	Identification caractérisation des nouveaux variants du RHD.....	46
B.	Ambiguïté du phénotype RhCE et détection des variants	50
a.	Ambiguïté du phénotype RhC ou RhC et Rhe.....	50
b.	Ambiguïté du phénotype Rhe.....	51
c.	Ambiguïté du phénotype Rhc.....	52
d.	Ambiguïté du phénotype RhE	52
e.	Identification caractérisation des nouveaux variants du RHCE	53
2.	Etude moléculaire des patients présentant une ambiguïté phénotypique au sein du système KEL.....	56
3.	Génotypage Vel	60
4.	Détection des allèles <i>YT*01</i> et <i>YT*02</i> par PCR allèle spécifique	61
V.	DISCUSSION.....	63
1.	Ambiguïté phénotypique du RHD	63
A.	Bioarray RHD.....	63
B.	Nouveaux variants RHD	64
2.	Ambiguïté phénotypique des antigènes RhC, Rhe, Rhc et RhE.....	65
A.	<i>RHCE*CeRN</i> et BioArray RHCE	65
B.	Nouveaux variants <i>RHCE</i>	66
3.	Ambiguïté phénotypique du système KEL.	68

4. Génotypage des systèmes Vel et YT.....	70
VI. CONCLUSION & PERSPECTIVES	73
VII. BIBLIOGRAPHIE	76
ANNEXE	80
Annexe 1	80
Annexe 2.....	81
Annexe 3.....	82
Annexe 4.....	83
Annexe 5.....	84
Annexe 6.....	85

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I. Les 36 systèmes de groupes sanguins érythrocytaire	13
Tableau II. Nombre d'unités de sang rares congelées et délivrées dans les Banques de Sang Rare de plusieurs pays d'Europe.	16
Tableau III. Exemples d'haplotypes RHD-RHCE rencontrés dans les populations d'ascendance africaine	24
Tableau IV. Anticorps anti-RhD utilisés pour la cytométrie en flux.....	44
Tableau V. Caractérisation des dix nouveaux variants <i>RHD</i>	49
Tableau VI. Nombre d'échantillons réceptionnés et techniques utilisées en fonction de l'antigène en ambiguïté.....	50
Tableau VII. Description des six nouveaux variants du gène <i>RHCE</i> et prédiction de l'impact des polymorphismes non-sens sur la stabilité de la protéine RhCE.....	55
Tableau VIII. Description des six nouveaux variants du <i>KEL</i>	57

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Définition des phénotypes érythrocytaires rares.....	15
Figure 2. Bases moléculaires des phénotypes RhD négatif.....	17
Figure 3. Structure la membrane du globule rouge et organisation du complexe RH au sein du macro-complexe de la bande 3.	19
Figure 4. Représentation des allèles <i>RHCE</i>	21
Figure 5. Variants les plus courants du gène <i>RHCE</i> dans les populations d'Afrique sub-saharienne.....	23
Figure 6. Schéma du complexe des protéines Kell et XK.	27
Figure 7 . Schéma de la protéine AChE et localisation du polymorphisme faux-sens responsable des antigènes du système YT.....	31
Figure 8. Schéma de la protéine SMIM1.....	33
Figure 9. Lecture des puces Bioarray par superposition des images de codages des billes colorées avec les images de fluorescence obtenues	38
Figure 10. Positionnement des amorces et des sondes utilisées pour la discrimination allélique du phénotype déduit Vel.	42
Figure 11. Variants du gène <i>RHD</i> identifiés sur 461 échantillons analysés entre octobre 2014 et décembre 2016.....	45
Figure 12. Résultat de la cytométrie de flux du variants RHD(I25F).	48
Figure 13. Variants du gène <i>RHCE</i> identifiés en technique de 1 ^{ère} intention pour les ambiguïtés des antigènes RhC et Rhe sur 151 échantillons analysés.	52
Figure 14. Variants du gène <i>RHCE</i> identifiés en technique de 1 ^{ère} intention pour les ambiguïtés des antigènes Rhc et RhE sur 50 échantillons.....	53
Figure 15. Vue globale de la Modélisation de la structure 3D du domaine extracellulaire de la protéine Kell.....	58
Figure 16. Effet des substitutions des chaînes latérales des variants KEL.....	59

Figure 17. Résultats de l'analyse par discrimination allélique du <i>Vel</i>	60
Figure 18. Migration sur gel d'agarose des PCR allèles spécifique <i>YT*01</i> et <i>YT*02</i> (111 pb).	62

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acides aminés

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNothèque : bibliothèque d'acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BSA : sérum albumine bovine

CNRGS : Centre National de Référence des Groupes Sanguins

CGRs : concentrés de globules rouges

dNTP : désoxynucléosides

EFS-AM : Etablissement Français du sang Alpes Méditerranée

FAM : 6-carboxyfluorescein

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GR(s) : globule(s) rouge(s)

HEA : Human Erythrocyte Antigen

kDa : kiloDalton

ICL : intra cellulaire

Ig : Immunoglobuline

IHR : Immuno-Hématologie Receveur

ISBT : *International Society of Blood Transfusion*

M : membranaire

MGB : *minor groove binder*

MHFNN : Maladie Hémolytique du Fœtus et du Nouveau-Né

pb : paire de bases

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RAI : Recherche d'Agglutinines Irrégulières

Rh : Rhésus

RhAG : *Rh-Associated Glycoprotein*

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

I. INTRODUCTION

Le globule rouge (GR, érythrocyte ou hématie) est une cellule sanguine de 7µm de diamètre, dépourvue d'organites et de noyau et par conséquent qui ne possède pas d'acide désoxyribonucléique nucléaire (ADN). L'absence de noyau est, en partie, responsable de sa forme biconcave qui lui confère une très grande souplesse indispensable pour circuler dans les micro-capillaires des organes.

Le GR contient une forte quantité d'hémoglobine (30 pg/GR), responsable de la couleur rouge de son cytoplasme. Sa principale fonction est de véhiculer l'oxygène (O₂) aux cellules et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO₂). Ces échanges gazeux ainsi que les échanges ioniques sont facilités par la structure bi-lipidique de sa membrane et sa forme biconcave assurant une large surface d'échange.

La membrane du GR est constituée de 52 % de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides. Les glucides sont associés par une liaison covalente aux protéines et aux lipides. Les lipides sont principalement des phospholipides entre lesquels s'intercalent des molécules de cholestérol et des glycolipides. Ils se répartissent en une bicouche où sont enchâssées les protéines dites intégrées (comme la Bande 3 et les glycophorines), et les protéines périphériques associées soit aux protéines intégrées soit aux lipides de la face cytoplasmique. Ce réseau protéique constitue le cytosquelette membranaire responsable de la forme biconcave et de la déformabilité du GR. Le cytosquelette des GRs, mis en évidence au début des 80 comprend : la spectrine (dimère de sous-unité alpha et bêta), l'ankyrine, la protéine bande 4.1 (fixant l'actine), et l'actine [1].

La durée de vie des GRs est de 120 jours et leur concentration dans le sang est de $4,5 \times 10^6$ GRs/mm³. Les GRs dérivent de précurseurs présents uniquement dans la moelle osseuse chez l'adulte. Des cellules souches pluripotentes s'auto renouvèlent et se différencient en précurseurs irréversiblement engagés dans l'érythropoïèse pour produire des GRs anucléés.

Les anémies qu'elles soient d'origine médicale (drépanocytose, thalassémie), chirurgicale (opération prévue avec hémorragie), accidentelles (hémorragie suite à une blessure) ou obstétricale peuvent entraîner un défaut d'oxygénation des organes pouvant être responsable de dommages irréversibles. Le traitement de ces anémies est réalisé par des transfusions de concentrés de globules rouges (CGRs). Ainsi, les transfusions sont le plus souvent prévues (drépanocytose, patient en oncologie,

grossesse à risque...), et donc rarement réalisées en urgence (hémorragie suite à un accident...). La mission de l'EFS est de mettre à disposition à tout moment des produits sanguins qualifiés et compatibles ce qui implique le prélèvement chaque jour et ceci tout au long de l'année (près de 3 millions de dons collectés en 2014).

1. Les antigènes de groupe sanguin

A. Définition, classification

Un antigène de groupe sanguin est une structure moléculaire présente à la surface du GR (et éventuellement d'autres cellules) ayant la capacité d'entraîner, *in vivo*, la production d'un allo-anticorps spécifique (anticorps présent chez les sujets dépourvus de l'antigène correspondant). Ainsi, la caractérisation de ces antigènes a permis de mieux comprendre les conflits immunologiques lors d'une transfusion sanguine, d'une transplantation d'organes ou d'une grossesse avec anémie hémolytique néo-natale.

On distingue :

- les antigènes de nature glucidique constitués d'oligosaccharides liés de façon covalente à des protéines ou des lipides. Ils sont le produit indirect de gènes codant des glycosyltransférases, protéines qui résidentent de l'appareil de Golgi.

- les antigènes de nature protéique, produits primaires de gènes, portés par des polypeptides comportant un ou plusieurs domaines transmembranaires. Certains antigènes protéiques sont portés par des polypeptides liés à la membrane *via* une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) comme les protéines Dombrock (système DO) ou AchE (système YT).

La majorité des molécules portant des antigènes s'exprime au sein de tissus non-érythroïdes. Cinq fonctions biologiques ont été reconnues pour ces molécules : (i) des transporteurs et canaux, (ii) des récepteurs pour des micro-organismes (virus, bactéries, parasites), (iii) des protéines enzymatiques, (iv) des molécules d'adhérence et (v) des protéines de structures (**Tableau I.**).

On compte actuellement 36 systèmes de groupes sanguins et deux systèmes liés à des facteurs de transcription (GATA-1 et KLF1), 6 collections (série 200) incluant 15 antigènes non classés en système. Parallèlement, 17 antigènes de basse fréquence

(<1%, LFA) constituent la série 700 et 6 antigènes de haute fréquence (>99%, HFA) définissent la série 901. Cette classification est validée au niveau international par "*International Society of Blood Transfusion*" (ISBT).

Chaque système de groupe sanguin est défini par un gène (ou des gènes similaires), et chaque antigène est défini par une base moléculaire qui correspond à différentes formes alléliques dudit gène.

En fonction de leurs degrés d'immunogénicité les antigènes de groupes sanguins peuvent être responsables de conflits immunologiques lors de transfusions, de transplantations ou de grossesses. Ils peuvent conduire à des allo-immunisations anti-érythrocytaires (production d'allo-anticorps suite à une transfusion ou une grossesse) plus ou moins dangereuses pour le receveur. En effet, un patient recevant un ou des antigène(s) qu'il ne possède pas, peut s'immuniser et ainsi produire des anticorps contre ce(s) antigène(s). Ces immunisations peuvent, selon l'anticorps produit, ne pas entraîner de signes cliniques apparents, ou peuvent conduire à des hémolyses. Les réactions immunitaires les plus graves sont induites par des incompatibilités immunologiques avec les antigènes des systèmes ABO, RH et Kell pour lesquels le respect de la phéno-compatibilité lors des transfusions est déterminant et dont le phénotype est recherché pour tout donneur et patient.

La détermination du phénotype est historiquement réalisée par agglutination qui est la technique de base de l'immuno-hématologie pour la détermination des groupes sanguins (Annexe 1). Cette technique rapide, fiable et peu onéreuse peut s'avérer inadaptée dans certaines circonstances comme par exemple après une transfusion récente, dans le cas d'antigènes faiblement exprimés, ou en raison d'absence de réactifs spécifiques. D'autre part la réalisation du phénotype ne permet pas dans la majorité des cas de détecter et/ou de distinguer des variants faibles et partiels. La recherche de ces variants est pourtant intéressante dans le cas de transfusions itératives (drépanocytaire) pour éviter l'immunisation des patients.

Aujourd'hui, le développement du génotypage érythrocytaire permet de pallier à ces limites. En effet l'identification du (ou des) SNP(s) (*Single Nucleotide Polymorphism*) au niveau de l'ADN permet de prédire l'acide aminé présent dans la protéine et donc de déduire l'antigène exprimé. On parle alors de « phénotype déduit du génotype ».

Tableau I. Les 36 systèmes de groupes sanguins érythrocytaire

N° ISBT	Nom	Symbole	Gène(s)	Nature biochimique	Rôle avéré ou supposé
1	ABO	ABO	<i>ABO</i>	Prot. IC	Enzyme
2	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	Prot. TM-SG	Structure
3	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	Prot. IC	Enzyme
4	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	Prot. TM-MP	Transport
5	Luthéran	LU	<i>LU</i>	Prot. TM-SG	Adhérence
6	Kell	KEL	<i>KEL</i>	Prot. TM-SG	Enzyme
7	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	Prot. IC Ads-PI	Enzyme
8	Duffy	FY	<i>DARC</i>	Prot. TM-MP	Récepteur
9	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	Prot. TM-MP	Transport
10	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	Prot. TM-MP	Transport
11	Cartwright	YT	<i>ACHE</i>	Prot. GPI	Enzyme
12	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Prot. TM-SG	Adhérence
13	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	Prot. TM-SG	Enzyme
14	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	Prot. GPI	Enzyme
15	Colton	CO	<i>AQP1</i>	Prot. TM-MP	Transport
16	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	Prot. TM-SG	Adhérence
17	Chido/ Rogers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	Ads-PI	Contrôle Complément
18	H	H	<i>FUT1</i>	Prot. IC	Enzyme
19	Kx	XK	<i>XK</i>	Prot. TM-SG	Transport
20	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	Prot. TM-SG	Structure
21	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	Prot. GPI	Contrôle Complément
22	Knops	KN	<i>CR1</i>	Prot. TM-SG	Contrôle Complément
23	Indian	IN	<i>CD44</i>	Prot. TM-SG	Adhérence
24	Ok	OK	<i>BSG</i>	Prot. TM-SG	Adhérence
25	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	Prot. TM-MP	Ligand
26	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	Prot. GPI	Sémaphorine
27	I	I	<i>GCNT2</i>	Prot. IC	Enzyme
28	Globoside	GLOB	<i>B3GALT3</i>	Prot. IC	Récepteur
29	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	Prot. TM-MP	Transport
30	Rh-associated	RHAG	<i>RHAG</i>	Prot. TM-MP	Transport
31	Forssman	FORS	<i>GBGT1</i>	Prot. IC	Enzyme
32	Junior	JR	<i>ABCG2</i>	Prot. TM-MP	Transport
33	Langereis	LAN	<i>ABCB6</i>	Prot. TM-MP	Transport
34	Vel	VEL	<i>SM1M</i>	PTM-SG	Récepteur
35	CD59	CD59	<i>CD59</i>	Prot. GPI	Ligand
36	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	Prot. TM-MP	Transport

Prot IC : Protéine intracellulaire, Prot. TM-SG : Protéine transmembranaire Single-pass, Prot. TM-MP : Protéine transmembranaire Multi-pass, Prot. GPI : Protéine ancrée par un groupement GPI, Ads-PI : Protéine adsorbé par le plasma

B. Phénotype érythrocytaire rare

a. *Absence d'expression*

Un phénotype érythrocytaire rare est défini dans plusieurs contextes : (i) l'absence d'expression d'un antigène érythrocytaire de fréquence élevée, (ii) l'absence d'expression de plusieurs antigènes au sein d'un même système de groupe sanguin et (iii) l'absence d'expression de plusieurs antigènes de fréquences équilibrées au sein de plusieurs systèmes. Un phénotype est qualifié de rare si sa fréquence est inférieure à quatre pour mille en France. Cette valeur peut différer d'un pays, d'une région et d'une population à l'autre. Ainsi le phénotype Rh-négatif (Rh-) de fréquence équilibrée en France avec environ 15% de la population, s'avère être un phénotype rare en Chine avec une fréquence inférieure à un pour mille. Toutes les banques de sangs rares ne disposent donc pas des mêmes unités de sang de phénotype rare pour répondre aux besoins des populations ciblées [2, 3]. En plus de la notion de fréquence, un phénotype rare est également défini par une difficulté de disponibilité de produits sanguins compatibles. Par exemple les phénotypes Ax ou A3 ne sont pas considérés comme des phénotypes rares car la transfusion *via* des unités de sang O est toujours possible.

- Le phénotype érythrocytaire rare est le plus souvent défini par l'absence chez un individu d'un antigène érythrocytaire qui est présent dans la quasi-totalité de la population générale comme par exemple l'antigène Vel.

- Pour un système de groupe sanguin défini par l'expression d'un haplotype, le phénotype érythrocytaire rare est le résultat de l'absence d'expression de plusieurs antigènes au sein d'un même système. On peut citer le phénotype RH : 1, 2, 3, -4, -5 (DCCEE) qui résulte de la combinaison de deux haplotypes rares *RHD/CE* du système RH. En 2009, le nombre d'individus présentant ce phénotype rare répertoriés au CNRGS (Centre National de Référence des Groupes Sanguins) était de 83 [3].

- Les phénotypes érythrocytaires rares caractérisés par l'absence d'expression d'antigènes de fréquence équilibrée au sein de plusieurs systèmes de groupes sanguins ont une prévalence de quatre pour cent mille en France. C'est le cas de patients immunisés contre la plupart des antigènes dont ils sont dépourvus et qui ont donc développé un mélange complexe d'anticorps. Il existe une réelle difficulté pour la transfusion de ces patients en produits sanguins érythrocytaires.

b. Expression d'antigènes rares

A l'opposé, un phénotype érythrocytaire rare peut résulter de l'expression d'antigènes rares, aussi appelés "antigènes privés". Ces antigènes peuvent appartenir à une série ou à un système, comme par exemple l'antigène RH10 du système RH, peu retrouvé dans la population caucasienne (Fréquence <0.01%) (**Figure 1.**). Les anticorps correspondants sont appelés anti-privés.

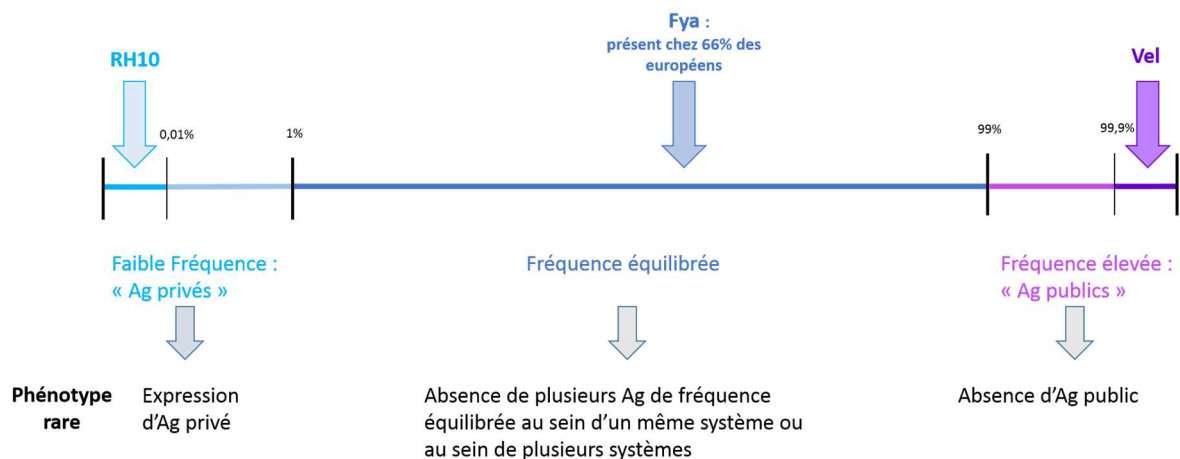


Figure 1 Définition des phénotypes érythrocytaires rares (d'après T. Peyrard, INTS).

c. Gestion des phénotypes érythrocytaires rares

Les patients présentant un phénotype érythrocytaire rare, posent d'énormes difficultés transfusionnelles. Seul le recours à des d'unités de sang de même phénotype permet d'assurer leur sécurité transfusionnelle. Le plus courant des phénotypes publics négatif est l'absence d'expression de l'antigène Vel associé éventuellement à des anticorps anti-Vel qui sont rapportés pour être responsables d'accidents immuno-hémolytiques transfusionnels et de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHFNN). Dans ce contexte, seule la disponibilité d'unité de sang Vel-négatif peut éviter l'impasse transfusionnelle.

Afin de pallier à une pénurie de produits sanguins rares, une politique d'incitation aux dons, ciblée sur les personnes présentant un phénotype rare, est menée. Ces personnes doivent donc, lorsque cela est possible, participer à un protocole d'autotransfusion en cas d'intervention chirurgicale programmée, et faire, si leur état

de santé le permet, des dons de sang qui seront conservés congelés à la Banque Nationale des Sangs de Phénotype Rare (BNSPR, Établissement français du sang Île-de-France, Créteil). Tous les patients et donneurs présentant un groupe sanguin rare sont suivis par le CNRGS, département de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS, Paris). En France métropolitaine et extra-métropolitaine, plus de 10.200 individus sont aujourd'hui répertoriés au CNRGS comme présentant un phénotype érythrocytaire rare [3]. Parallèlement à cette démarche d'incitation, il est crucial de bien gérer ces ressources limitées, la décision de délivrance de telles unités de sang est très délicate et prend en compte de nombreux critères dont la maladie, l'âge, le sexe du patient, le stock disponible et la rareté du produit sanguin (**Tableau II.**).

Tableau II. Nombre d'unités de sang rares congelées et délivrées dans les Banques de Sang Rare de plusieurs pays d'Europe [3-5].

Phénotype érythrocytaire rare	Nombre d'unités de sangs rares congelées					Nombre d'unités de sangs rares délivrées	
	France 2009	Italie 2012	Suisse 2014	Allemagne 2014	Autriche 2014	France de 1994 à août 2009	Italie de 2005 à juin 2012
KEL:1,-2	904	158	158	-	44	407	36
RH:-1,2,-3,-4,5	316	61	21	4	4	191	8
LU:1,-2	288	142	65	34	8	70	17
VEL:-1	269	30	28	6	0	126	11
YT:-1,2	238	228	50	27	36	275	7

2. Le système RH (ISBT 004)

Le système RH est le plus important en terme de sécurité transfusionnelle après le système ABO. Les cinq principaux antigènes de ce système sont : RhD (RH1), RhC (RH2), RhE (RH3), Rhc (RH4), et Rhe (RH5). La fréquence des différents phénotypes du système RH présente une grande diversité interethnique qui complique parfois l'acte transfusionnel. En effet les patients d'origine afro antillaise sont majoritairement de phénotype Dce (45.8%) alors que seuls 2.1% des Européens présentent ce phénotype [2].

A. Les bases moléculaires du système RH

Le système RH a été décrit pour la première fois il y a plus de 75 ans, par Lévine qui suggérait l'existence, sur les GRs du fœtus, d'un antigène hérité du père et pour lequel la mère avait développé un anticorps [6]. De nombreux auteurs ont émis diverses hypothèses [7, 8] mais ce sont les études à partir de 1985 qui ont défini les bases génétiques du système RH. Ces études décrivent l'existence du locus *RH* constitué de deux gènes : le gène *RHD* qui produit l'antigène RhD et le gène *RHCE* qui produit les antigènes RhC/c, et RhE/e [9, 10] qui sont antithétiques deux à deux (l'absence de l'un implique la présence de l'autre).

Les deux gènes *RHD* et *RHCE* sont situés sur le bras court du chromosome 1 (1p34.1-1p36). Ils sont étroitement liés, orientés en tandem inversé (**Figure 2.**) et séparés de 30 kilobases (kb) contenant le gène *SMP1* (*Small Membrane Protein 1*), dont la fonction n'est pas connue. Les gènes *RHD* et *RHCE* présentent 96 % de similarité, et sont composés chacun de 10 exons. Le gène *RHD* est flanqué en 5' et en 3' de deux séquences d'environ 9 kb, avec 98,6% de similarité, et d'orientation identique appelées "boîtes rhésus".

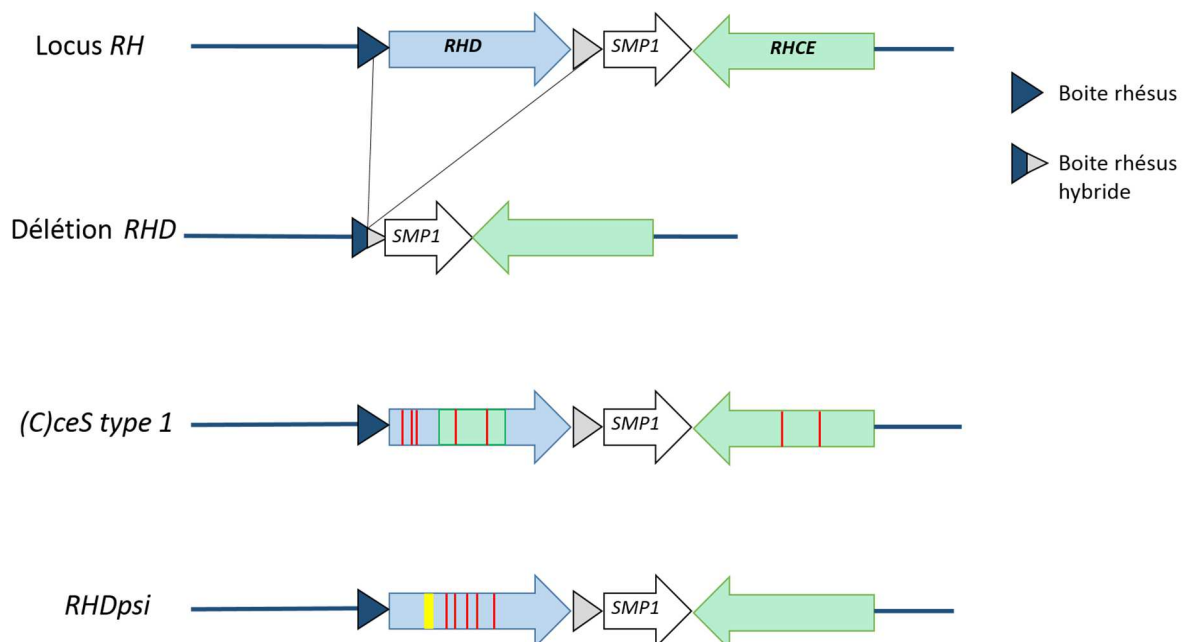


Figure 2. Bases moléculaires des phénotypes RhD négatif. Les flèches, bleue pour le gène *RHD* et verte pour le gène *RHCE*, indiquent l'orientation des gènes. Pour l'haplotype *(C)ceS type 1* les positions des polymorphismes 186G>T, 410C>T, 455A>C, 733C>G et 1006G>T du *RHD* et 733C>G et 1006G>T du *RHCE* sont en rouge. Pour l'allèle *RHD***RHDpsi* la position de la duplication de 37 pb est en jaune et celles des polymorphismes 609G>A, 654 G>C, 667T>G, 674C>T, 807T>G en rouge.

B. Le complexe RH et sa fonction

Produits directs des gènes *RHD* et *RHCE*, les protéines RhD et RhCE sont constituées chacune de 417 acides aminés. Elles se localisent dans la bicouche lipidique de l'érythrocyte qu'elles traversent à douze reprises, les extrémités carboxy- et amino-terminales étant intracytoplasmiques. Les polypeptides Rh ne sont pas glycosylés, mais portent trois acides palmitiques intramembranaires qui facilitent leur ancrage à la bicouche lipidique.

Les polypeptides RhD et RhCE appartiennent à la famille des protéines Rh. Cette famille comprend également les protéines RhAG, RhBG et RhCG. Les protéines RhD, RhCE et RhAG sont strictement érythroïdes alors que les glycoprotéines RhBG et RhCG sont exprimées dans le foie et le rein [11].

Les protéines RhD, RhCE et RhAG sont associées entre elles ainsi qu'à d'autres protéines membranaires (LW, CD47 et GYPB) par des liaisons non covalentes pour former le complexe RH. Ce complexe appartient au macro-complexe de la Bande 3, qui est associé au cytosquelette (constitué de spectrine α et β) via la protéine 4.2 et l'ankyrine (**Figure 3.**). Ceci contribue à la stabilité et au maintien des propriétés mécaniques de la membrane érythrocytaire.

La protéine RhAG est une protéine *N*-glycosylée de 50kDa, exprimée au cours de la différenciation érythroïde, en amont des protéines Rh à partir du stade BFU-E (*Burst Forming Unit Erythroid*). Cette protéine est indispensable à la formation du complexe RH et à son adressage à la membrane du GR. Des variations de cette protéine affectent l'expression des protéines RhD et RhCE.

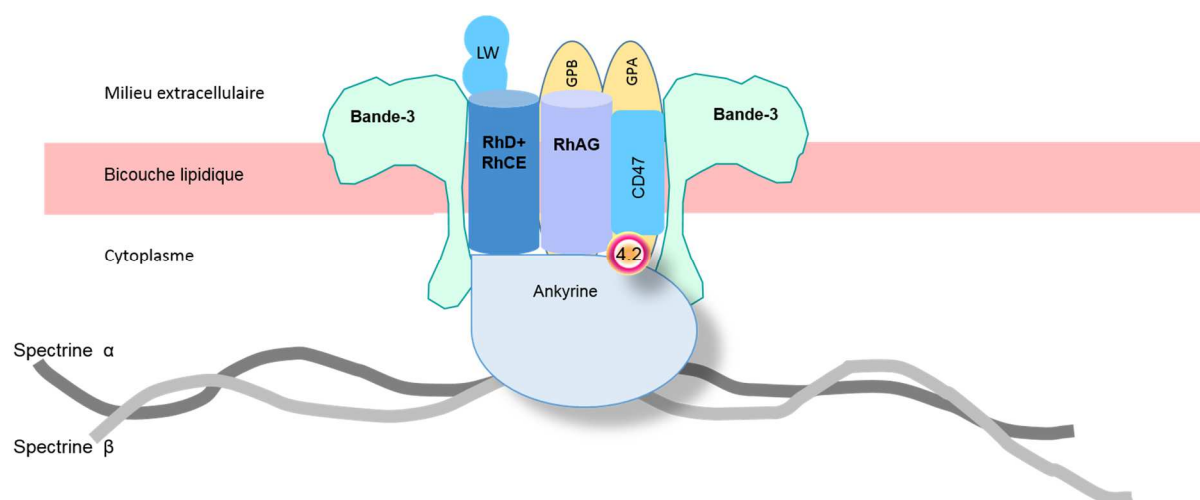


Figure 3. Structure de la membrane du globule rouge et organisation du complexe RH au sein du macro-complexe de la bande 3.

La fonction des protéines Rh n'est pas clairement établie, cependant leur structure organisée en 12 domaines transmembranaires semble s'apparenter à la structure des protéines de transport. De plus, une étude phylogénétique a révélé une relation ancestrale de la protéine RhAG avec des transporteurs d'ammonium [12]. Une autre étude montre que les protéines de la famille Rh jouent un rôle dans le transport membranaire du NH_3 [13]. Alors qu'une dernière étude suggère l'implication de RhAG dans le transport de CO_2 [14].

C. Bases moléculaires du phénotype RhD-positif / RhD-négatif

Le phénotype RhD positif est caractérisé par l'expression de la protéine RhD alors que le phénotype RhD négatif est caractérisé par son absence [15]. Dans les populations d'Europe de l'Ouest le phénotype RhD négatif, observé chez 15% des individus, est principalement associé à une délétion du gène *RHD*. Cette délétion est le résultat d'un *crossing over* inégal entre les deux boîtes rhésus ce qui entraîne l'apparition d'une boîte rhésus hybride (**Figure 2.**). Dans ces populations le phénotype RhD positif est donc associé à la présence soit de deux allèles *RHD* (homozygote 37.5%), soit d'un seul allèle *RHD* en *trans* de la délétion du gène *RHD* (hémizygote 47.5%).

Concernant les populations d'Afrique subsaharienne, le phénotype RhD négatif est observé chez 8% des individus. Il peut résulter, en dehors de la délétion, de deux

autres gènes *RHD* inactivés. Le plus fréquent est la présence d'un pseudogène *RHD***RHDpsi* observé chez 66% des phénotypes RhD négatif [16]. Cet allèle est caractérisé par une duplication de 37 pb dans la région intron 3/exon 4 ainsi que plusieurs polymorphismes dans les exons 5 et 6. La protéine traduite présente un codon stop prématuré en position 210. Le second allèle silencieux est l'haplotype (*C*)*ce^s type 1* retrouvé chez 15% des phénotypes RhD négatifs [17, 18]. Dans cet haplotype les exons 4 à 7 du gène *RHD* sont remplacés par les exons correspondants du gène *RHCE*. Trois polymorphismes nucléotidiques sont également présents : 186G>T dans l'exon 2, 410C>T et 455A>C dans l'exon 3. En *cis*, le gène *RHCE* présente les polymorphismes 733C>G dans l'exon 5 et 1006G>T dans l'exon 7. Le variant (*C*)*ce^s type 1* présente un profil antigénique RhD négatif avec l'expression faible et partielle des antigènes RhC et Rhc, et faible de l'antigène Rhe.

Dans les populations asiatiques le phénotype D-négatif est très rare, il résulte d'autres allèles *RHD* altérés [19].

D. Bases moléculaires du phénotype Rhc/RhC et Rhe/RhE

Les allèles *RHCE***c* et *RHCE***C* codant respectivement les antigènes Rhc et RhC, se distinguent par des substitutions nucléotidiques en position 48G>C (Trp16Cys) dans l'exon 1, 150C>A (Val130Val), 178C>A (Leu60Ile), 201A>G (Ser67Ser), 203A>G (Asn68Ser), 307C>T (Pro103Ser) dans l'exon 2 et par la présence d'une insertion de 109 pb dans l'intron 2 (*IVS2Ins109*) de l'allèle *RHCE***C* (**Figure 4.**). Il est à noter que l'expression conformationnelle de l'antigène RhC est liée à l'expression de l'exon 2 dans un contexte RhCE. A l'opposé, dans un contexte RhD, il ne s'exprime pas.

Concernant les allèles *RHCE***E* et *RHCE***e*, ils se distinguent au niveau nucléotidique par une transversion 676C>G dans l'exon 5 à la base de la substitution Pro226Ala localisée dans la quatrième boucle extracellulaire du polypeptide RhCE. L'alanine en position 226 fait apparaître uniquement l'antigène Rhe dans un contexte RhCE et absent dans un contexte RhD.

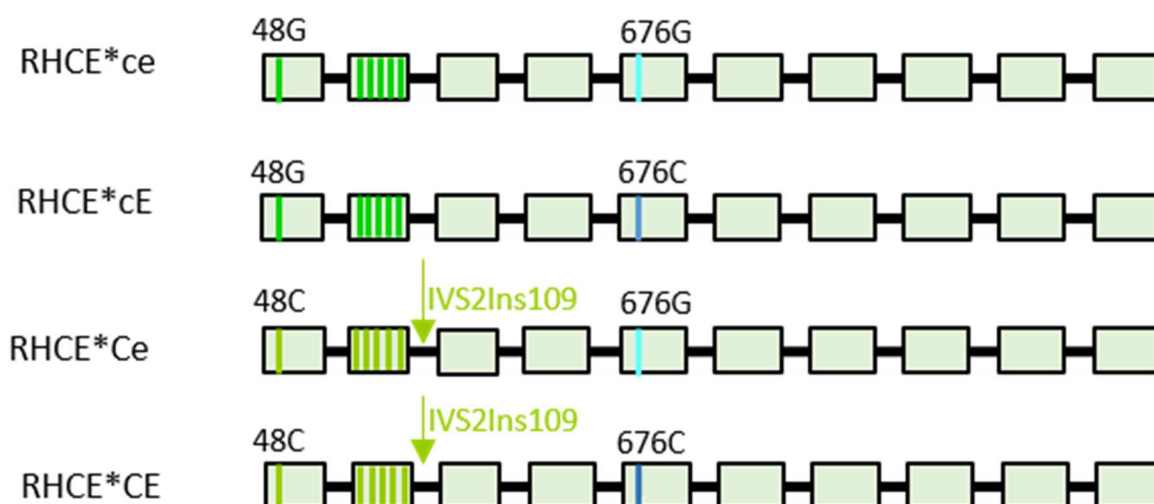


Figure 4. Représentation des allèles *RHCE*. Les 10 exons des allèles *RHCE* sont représentés par des rectangles verts. Les traits verts dans l'exon 2 correspondent pour l'allèle *RHCE**C aux nucléotides : 150A, 178A, 201G, 203G et 307T et pour l'allèle *RHCE**c aux nucléotides : 150C, 178C, 201A, 203A et 307C. IVS2Ins109 représente l'insertion de 109 pb présente dans l'intron 2 de l'allèle *RHCE**C. Les polymorphismes qui distinguent le *RHCE**E du *RHCE**e sont en bleu.

E. Bases moléculaires des variants RhD faibles et partiels.

Le système RH est l'un des systèmes de groupes sanguins érythrocytaires les plus polymorphes avec plus de 60 antigènes publics ou privés identifiés au fur et à mesure de la mise en évidence des anticorps correspondants. Ce polymorphisme important résulte de la structure du locus *RH* en tandem inversé qui favorise des phénomènes de conversion génique directe ou indirecte qui sont à la base de cette diversité génétique. Ainsi un niveau élevé de diversité est retrouvé dans les populations les plus anciennes comme les populations d'Afrique subsaharienne. Parallèlement à cela, il a été identifié un très grand nombre de variants des gènes *RHD* et *RHCE* via des altérations qualitatives et quantitatives de l'expression des antigènes RhD, C, c, E, e.

L'antigène RhD est sérologiquement défini comme une mosaïque d'au moins neuf déterminants, les épitopes epD1 à epD9 [20]. La détection de ces épitopes peut déterminer les phénotypes RhD positif mais également les phénotypes RhD faibles, Del et partiels. Les phénotypes RhD faibles expriment tous les épitopes de l'antigène RhD, mais présentent une expression affaiblie inférieure à 10.000 sites RhD/GR *versus* 10.000 à 35.000 sites/GR pour un phénotype RhD positif [21]. Par conséquent,

lors de la détermination du phénotype, une diminution de l'intensité d'agglutination est observée. Les phénotypes RhD faibles sont essentiellement la conséquence de substitutions d'acides aminés ponctuelles souvent localisées au sein des domaines transmembranaires ou dans les boucles intracytoplasmiques. Les sujets de phénotype D faible type 1, 2 et 3 ne s'immunisent que très rarement et sont transfusés avec des concentrés de globules rouges (CGRs) RhD positif [22].

Parallèlement, une catégorie de variants RhD très faible (exprimant moins de 200 sites RhD/GR), apparaissent négatifs avec les réactifs et les techniques classiques de typage. Ils apparaissent cependant RhD positif, avec la technique de fixation / élution de l'anti-D, d'où la dénomination de variant Del pour *D-elute*. Plus de 30% des individus de phénotype RhD-négatif en Asie de l'Est sont de phénotype Del en raison de l'expression de l'allèle *RHD(K409K)*. Bien que cela ne semble pas le cas du variant *RHD(K409K)*, certains des variants Del ont la capacité d'immuniser un receveur RhD négatif [23].

Le phénotype RhD partiel, est caractérisé par l'absence d'un ou de plusieurs épitope(s) [20]. Initié par Tippett et Sanger, ces antigènes partiels ont eu leur propre classification basée sur la constatation que des individus RhD-positif suite à une transfusion ou lors d'une grossesse peuvent produire des anticorps anti-RhD. Dans un second temps, cette classification a été précisée grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes. Aujourd'hui, deux modèles épitopiques de la molécule RhD coexistent, le modèle simplifié à 9 épitopes et le modèle à 30 épitopes [24]. Il est à noter, que certains polymorphismes du gène *RHCE* peuvent aboutir à l'expression d'une partie des épitopes RhD, alors qu'en *cis* le gène *RHD* est absent. On donnera pour exemple, le gène hybride *RHCE*ce-D(5)-ce* et les allèles *RhCE*ceRT* et *RhCE*ceSL*.

Aujourd'hui l'observation d'allo-immunisation avec certaines catégories de D faibles et l'expression faible de certaines épitopes de D partiels démontrent que la frontière entre les D faibles et partiels reste à préciser. Il convient donc de ne plus les distinguer et plutôt de parler de variants RhD. Ces variants sont facilement identifiables par biologie moléculaire mais seule l'association d'un variant à la production d'anticorps chez le porteur permet de le classer dans la catégorie des partiels.

F. Bases moléculaires des variants RhCE faibles et partiels.

Sur les mêmes mécanismes moléculaires que pour le *RHD*, des variants du gène *RHCE* ont été décrits. Ces variants peuvent être à la base de phénotypes faibles ou partiels. Les variants du gène *RHCE* sont fréquemment retrouvés dans les populations d'Afrique subsaharienne, le plus souvent portés par les allèles *RHCE*ce*. Les modifications d'expression des antigènes RhC, Rhc, RhE et Rhe sont alors fréquemment associées à l'expression d'antigènes de faible fréquence et parfois à l'absence d'expression d'antigène de haute fréquence. Les variants les plus fréquents dans les populations originaires d'Afrique sub-saharienne sont décrits dans la **Figure 5**.

Allèle	Gène RHCE et polymorphismes présents	Ag altéré	Ag de basse fréquence exprimé	Ag de haute fréquence absent
RN	577G 	C, e	RH:32, 54	RH:46
(C)ce^s(1006)	733G 1006T 	C, c, e	RH:20	RH:31, 34
ceAR	712G,733G,787G,800A,916G 	c, e	RH:10	RH:18, 19
ceEK	712G,787G,800A 	e		RH:18, 19
ceBI	712G,818T,1132G 	e	RH:49	RH:18, 19
ceSM	712G 	e	RH:49	RH:18, 19
ce^s(340)	340T, 733G 	c, e	RH: 10, 20, 48	RH:57
ceMO	667T 	c, e		RH:19, 31, 61
ce(254)	254T 	e		RH:31, 59
ce(733)	733G 	e	RH: 10, 20	RH:31
ceTI	1025T 	c, e	RH: 10	

Figure 5. Variants les plus courants du gène *RHCE* dans les populations d'Afrique sub-saharienne. Les rectangles représentent les 10 exons en vert pour *RHCE*, en violet pour *RHD*. Les traits représentent les polymorphismes présents.

G. Haplotype RHD / CE source de complexité

Les variants *RHD* ou *RHCE* associés à des phénotypes partiels engendrent des problèmes lors des transfusions notamment dans les populations d'ascendance africaine et tout particulièrement chez les patients drépanocytaires qui nécessitent des transfusions itératives. Ces complications transfusionnelles sont encore accentuées par la transmission sous forme d'haplotype des allèles *RHD* et *RHCE* (**Tableau III.**). C'est le cas par exemple des haplotypes *RHD***DAR*-*RHCE***ceAR*, *RHD***DIIIa*-*RHCE***ceTI* qui entraînent chez un même patient un phénotype RhD partiel et Rhce partiel. Ces haplotypes entraînent l'expression d'antigènes de faible fréquence et parfois l'absence d'expression d'antigène de haute fréquence (exemple du RH :-34 et RH-18 qui peuvent poser des difficultés pour trouver des unités de sang compatibles.

Tableau III. Exemples d'haplotypes *RHD*-*RHCE* rencontrés dans les populations d'ascendance africaine

Allèle <i>RHD</i>	Allèle <i>RHCE</i>	Antigènes altérés
<i>RHD</i> * <i>DAR</i>	<i>RHCE</i> * <i>ceAR</i>	D, c, e
	<i>RHCE</i> * <i>ceEK</i>	D, e
<i>RHD</i> * <i>DOL1</i>	<i>RHCE</i> * <i>ceBI</i>	D, e
	<i>RHCE</i> * <i>ceSM</i>	D, e
<i>RHD</i> * <i>DOL2</i>	<i>RHCE</i> * <i>ceBI</i>	D, e
	<i>RHCE</i> * <i>ceSM</i>	D, e
<i>RHD</i> * <i>DAU0</i>	<i>RHCE</i> * <i>ce^S</i> (340)	c, e
	<i>RHCE</i> * <i>ceMo</i>	c, e
<i>RHD</i> * <i>RHDIIIa</i> - <i>CE</i> (4-7)- <i>D</i>	<i>RHCE</i> * <i>ce^S</i> (1006)	C, c, e
<i>RHD</i> * <i>DIIIa</i>	<i>RHCE</i> * <i>ce^S</i>	D, e
<i>RHD</i> * <i>DIVa</i> -2	<i>RHCE</i> * <i>ceTi</i>	D, c, e

H. Le phénotype Rh_{nul} et D-/-

Le phénotype Rh_{nul} est très rare et caractérisé par une absence totale d'expression des antigènes du système RH (et également des antigènes LW et FY5). Deux mécanismes responsables du phénotype Rh_{nul} ont été décrits. Le premier, le phénotype dit « amorphe », est l'absence d'expression du gène *RHCE* associé à une délétion du gène *RhD*. Le second, le phénotype dit « régulateur », est dû à des polymorphismes du gène *RHAG* entraînant l'absence d'expression de RhAG. En

l'absence de RhAG, le complexe RH n'est pas assemblé et n'est pas transporté à la surface des globules rouges. Les GRs Rh_{nul} sont morphologiquement et fonctionnellement anormaux ce qui entraîne une anémie plus ou moins sévère. Les patients présentant ce phénotype sont considérés à risque d'allo-immunisation et sont donc transfusés avec des CGRs de phénotype Rh_{nul}.

Le phénotype D-/- est défini par une absence d'expression des antigènes RhC, Rhc, RhE et Rhe, associée une augmentation de l'antigène RhD. Les sujets dépourvus des antigènes Rhce sont aussi dépourvus de l'antigène public RH17, et peuvent donc produire un anticorps anti-public associé à des risques cliniques importants dans le cadre de grossesse ou de transfusion.

I. Alloimmunisation anti-RH et sa gestion

Dans les populations d'Europe de l'Ouest, plus de 80% des échantillons ayant une ambiguïté de phénotype RhD sont des phénotypes D faible type 1, 2 et 3 alors que dans les populations d'ascendance africaine les variants les plus fréquemment rencontrés sont de type *RHD*DAU-0* et *RHD*DAR* [25-29]. Les patients de phénotype D faible type 1, 2 et 3, ne présentent pas de risque d'allo-immunisation et peuvent être transfusés avec des concentrés de globules rouges (CGRs) RhD positifs [30]. Par contre, les patients porteurs d'autres variants sont considérés à risque d'allo-immunisation et sont donc transfusés avec des CGRs RhD négatif [31]. Les variants des gènes *RHCE* sont peu fréquents dans les populations d'Europe de l'Ouest par contre de nombreux sont décrits dans les populations d'Afrique subsaharienne, la plupart portés par des allèles *RHCE*ce*. Dans ces populations les phénotypes partiels sont souvent associés à l'expression d'antigènes de faible fréquence, le plus souvent RH10 (V) et/ou RH20 (VS).

J. Les anticorps anti-Rh

La plupart des allo-anticorps anti-RhD sont des anticorps irréguliers, retrouvés chez des personnes de phénotype RhD-négatif ou RhD partiel. De type IgG ces anticorps n'activent pas le complément. Les immunisations provoquent des hémolyses intravasculaires, qui peuvent être soit des hémolyses aigues responsables de

syndrome hémorragique, choc anaphylactique ou œdème pulmonaire ; soit des hémolyses retardées responsables d'ictère et d'hémoglobinurie.

La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHFNN) peut apparaître lors de la seconde grossesse d'une femme RhD négatif sensibilisée portant un enfant RhD positif. Les hématies fœtales RhD positives dans la circulation sanguine de la mère entraînent une allo-immunisation, avec production d'anticorps anti-RhD de type IgG qui, contrairement aux IgM, traversent la barrière placentaire. Cette allo-immunisation peut être responsable chez le nouveau-né d'un ictère, d'une anémie plus ou moins sévère et parfois même d'une mort fœtale.

Dans la population caucasienne on classe le degré d'immunogénicité de la façon suivante : D>c>E>C>e. Les anticorps anti-c et anti-e moins fréquents, sont souvent retrouvés dans les populations afro-antillaises. Il existe d'autres anticorps anti-RH, comme l'anti-RH34 ou l'anti-RH18 (anti-publics) qui peuvent être impliqués dans des cas gravissimes d'hémolyse post-transfusionnelle.

3. Le système de groupe sanguins KEL (ISBT 006)

A. Le gène et la protéine Kell

Le système KEL est porté par une glycoprotéine transmembranaire de type II appelée aussi CD238 [32]. Cette protéine de 93 kDa pour 732 acides aminés (aa) est codée par le gène *Kell* situé sur le bras long du chromosome 7 en position q34. Le gène couvre 21.5kb et est composé de 19 exons.

La protéine Kell possède 6 sites potentiels de *N*-glycosylation, et 16 résidus cystéines. La cystéine en position 72 est liée par un pont disulfure à la cystéine 347 de la protéine XK (**Figure 6.**). Cette liaison est nécessaire pour le maintien de Kell à la surface des hématies. La protéine XK constituée de 444 aa, est codée par le gène *XK* qui est situé sur le chromosome Xp21.1 et porte l'antigène de haute fréquence Kx.

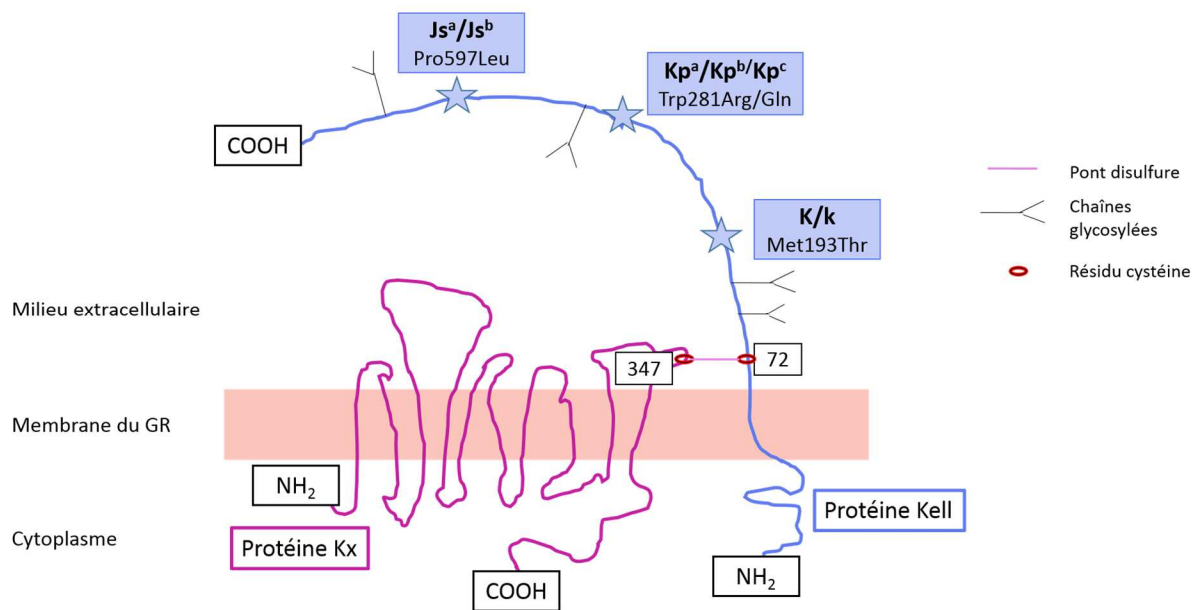


Figure 6. Schéma du complexe des protéines Kell et XK. Localisation des polymorphismes à la base des principaux antigènes du système KEL.

La protéine Kell est spécifique de la lignée érythrocytaire, elle possède une activité enzymatique qui clive l'endothéline-3 en un peptide bioactif ayant des propriétés vasoconstrictrices. *In vivo*, le rôle de cette activité enzymatique à la surface des hématies n'est pas encore défini.

B. Les antigènes du système KEL

Le système KEL rassemble plus de 30 antigènes parmi lesquels 10 antigènes de basse fréquence, les autres étant des antigènes de haute fréquence. Les principaux antigènes antithétiques transfusionnels sont KEL1(K)/KEL2(k), KEL3(Kp^a)/KEL4(Kp^b)/KEL21(Kp^c) et KEL6(Js^a)/KEL7(Js^b).

a. *Les antigènes KEL1 (K) et KEL2 (k)*

Les antigènes KEL1 et KEL2 sont codés respectivement par les allèles *KEL**01 et *KEL**02. Ces deux allèles diffèrent par le polymorphisme 578T>C dans l'exon 6 qui se traduit par la présence en position 193 d'une méthionine (Met193) pour l'allèle *KEL**01 ou d'une thréonine (Thr193) pour l'allèle *KEL**02. Ce changement d'acide aminé

affecte la *N*-glycosylation de la protéine Kell [33]. Une expression affaiblie de l'antigène KEL1 a été décrite associée à la présence d'une sérine en position 193 (c.577T>A).

Il a également été décrit que le produit de l'allèle *KEL**01 est inactif alors que le produit de l'allèle *KEL**02 présente une activité catalytique similaire aux métalloprotéases [33]. Cette différence serait liée à un changement dans la conformation de la protéine Kell.

Dans les populations d'Europe de l'Ouest l'antigène KEL1 est présent chez 8 à 9% des individus alors que l'antigène KEL2 est présent chez plus de 90% des individus [34]. L'absence de l'antigène KEL2 est observée chez moins de 0.2% des individus d'Europe de l'Ouest [2].

b. Les antigènes KEL3 (Kp^a), KEL4 (Kp^b) et KEL21 (Kp^c)

Les antigènes KEL3 (Kp^a), KEL4 (Kp^b) et KEL21 (Kp^c) sont les produits des 3 allèles codominants *KEL**03, *KEL**04 et *KEL**21. Les allèles *KEL**03 et *KEL**04 diffèrent par le polymorphisme 841T>C dans l'exon 8 qui code, en position 281, un tryptophane (antigène KEL3) ou une arginine (antigène KEL4). La présence d'un tryptophane modifie le repliement de la protéine au cours de sa synthèse ce qui affecte son transport à la membrane et entraîne une faible réactivité de l'ensemble des antigènes Kell sur les globules rouges exprimant KEL3 [35]. Avec une fréquence de 2.3% dans les populations européennes, l'antigène KEL3 (Kp^a) est rare, et les individus *KEL**03/*03 représente 1/2.500 individus [2], alors que l'antigène KEL4 (Kp^b) est très fréquent (il s'agit d'un antigène « public »).

L'allèle *KEL**21 présente quant à lui, une substitution en position 842G>A dans l'exon 8 qui se traduit par une glutamine en position 281. Cet allèle n'a été décrit que chez deux individus dont l'un est homozygote [36].

c. Les antigènes KEL6 (Js^a), KEL7 (Js^b)

Les allèles *KEL**06 et *KEL**07 diffèrent par un polymorphisme dans l'exon 17 en position 1790C>T. Ainsi on observe une proline en position 597 pour l'antigène KEL6 ou une leucine pour l'antigène KEL7. L'antigène KEL6 (Js^a) est exceptionnel dans les populations d'Europe de l'Ouest alors que sa fréquence atteint 20% dans les populations d'Afrique sub-saharienne [37, 38].

C. Phénotypes McLeod, K_{mod} et Kell_{nul}

De façon assez similaire à ce qui est décrit dans le système RH, des phénotypes rares faibles (K_{mod}, McLeod), et nuls (Kell_{nul} ou K₀) sont décrits.

On observe un affaiblissement des antigènes du système KEL chez les personnes ayant des phénotypes McLeod et/ou K_{mod}. Chez les individus de phénotype McLeod, l'absence de la protéine XK est responsable de la diminution de l'expression de tous les antigènes du système KEL. De nombreux symptômes (troubles neuromusculaires, troubles nerveux...) évoquent ce phénotype. Le gène *XK* étant situé sur le chromosome X, la majorité des patients sont des hommes.

Chez les individus de phénotype K_{mod}, la faible expression des antigènes Kell peut être plus ou moins marquée. Parfois, l'affaiblissement est tellement prononcé que la technique de fixation-élution est réalisée pour détecter les antigènes. En présence de ce phénotype, la réactivité de l'antigène Xk est quant à elle, plus élevée [39]. Les sujets K_{mod} peuvent s'immuniser en présence d'hématies de phénotypes Kell courant. Les anticorps produits, parfois désignés *anti-Ku-like*, réagissent avec les GRs de phénotype Kell courant mais ne réagissent pas avec celles de phénotype Kell_{nul}. Plusieurs allèles codants pour des phénotypes K_{mod} sont décrits et la plupart sont associés à l'allèle *KEL*02* [40].

Le phénotype Kell_{nul} est caractérisé par l'absence de tous les antigènes Kell associée à une augmentation de l'expression de l'antigène Kx. Cette augmentation d'expression serait due à la grande accessibilité des sites antigéniques par les anti-Kx. La fréquence de ce phénotype est très faible (de 1/15.000 à 1/25.000 dans la population totale). Les patients ayant ce phénotype ne présentent pas d'anomalies, mais ils peuvent toutefois produire des anticorps anti-Kell. Ces anticorps peuvent avoir une spécificité isolée (anti-KEL4, anti-KEL2) mais le plus souvent ils ont une spécificité étendue dite anti-Ku (pour universel) qui reconnaît toutes les hématies Kell, excepté les hématies Kell_{nul}.

D. Les anticorps anti-Kell

Après l'antigène RH1, l'antigène KEL1 est le plus immunogène des antigènes de groupes sanguins. De ce fait sa détermination en immunohématologie est généralement associée au phénotype RH.

Il existe des auto-anticorps pour le système KEL, qui peuvent être de type IgG, certains de type IgM et très rarement de type IgA. Les allo-anticorps quant à eux sont généralement immuns, ils peuvent activer la fixation du complément et peuvent être responsables des réactions hémolytiques sévères lors d'une transfusion, ou de MHFNN. Les allo-anticorps anti-KEL les plus fréquents sont les anti-KEL1. Ils sont rencontrés dans 5% des cas après une transfusion incompatible KEL1 [41]. Les anti-KEL3 (anti-Kp^a) peuvent être impliqués dans des réactions transfusionnelles hémolytiques sévères mais aussi des MHFNN sévères [42]. Il existe aussi des anti-KEL3 naturels irréguliers. Les anti-KEL6 (Js^a) peuvent être responsables de réactions transfusionnelles hémolytiques et de MHFNN modérées ou sévères. Les anti-KEL7 (anti-Js^b) sont très rares étant donné que l'antigène KEL6 (Js^a) est exceptionnel dans les populations d'Europe de l'Ouest, mais ils peuvent générer des réactions transfusionnelles et de MHFNN qui peuvent être sévères.

4. Antigènes de faible et haute fréquence : les systèmes Cartwright et Vel

A. Système Cartwright : YT (ISBT 011)

a. *Le gène et la protéine*

Les deux antigènes du système Cartwright sont portés par la glycoprotéine érythrocytaire acétylcholinestérase (AChE) (**Figure 7.**). Cette AChE de 535 aa, *N*-glycosylée est exprimée dans les tissus nerveux, le cerveau, les muscles et la lignée érythrocytaire. Dans le tissu nerveux, elle dégrade l'acétylcholine (un neurotransmetteur) en choline et acétate, ce qui permet au neurone de revenir à son état de repos après l'activation. La protéine AChE est ancrée dans la membrane des GRs *via* un groupement GPI (*glycosyl-phosphatidylinositol*) comme c'est également le cas des protéines qui portent les groupes sanguins Dombrock, Cromer, JMH et

CD59. Cet ancrage est réalisé par une glycosyltransférase, produit du gène *PIG-A* (*glycosyl-phosphatidylinositol complementation group A*) [43]. Une expression faible de AChE est rapportée dans le cadre de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN). Le tableau clinique de la HPN, qui associe anémie hémolytique, hémoglobinurie (présence d'hémoglobine dans les urines) et éventuellement thromboses, est dû à une mutation acquise du gène *PIG-A*. Ainsi, on observe l'expansion de clones, notamment érythrocytaires, déficitaires en protéines ancrées via un groupement GPI. Des études ont d'ailleurs montré l'absence d'expression des antigènes du système Yt chez les patients atteints de HPN [43, 44].

L'AChE est codé par un gène localisé sur le chromosome 7 en position q22. Le gène *AChE* est long de 2.2kb et est constitué de 6 exons [45]. Les allèles *YT*01* et *YT*02* qui codent respectivement les antigènes Yt^a et Yt^b diffèrent par trois polymorphismes. Le premier est situé dans l'exon 2 en position 1057 (C>A) et se traduit par la présence en position 353 soit d'une histidine (Yt^a) soit d'une asparagine (Yt^b). Les deux autres polymorphismes localisés dans les exons 3 et 5 sont des polymorphismes synonymes qui ne conduisent donc pas à un changement d'acide aminé. Aucune étude ne rapporte un effet sur l'épissage du transcrit *Yt*.

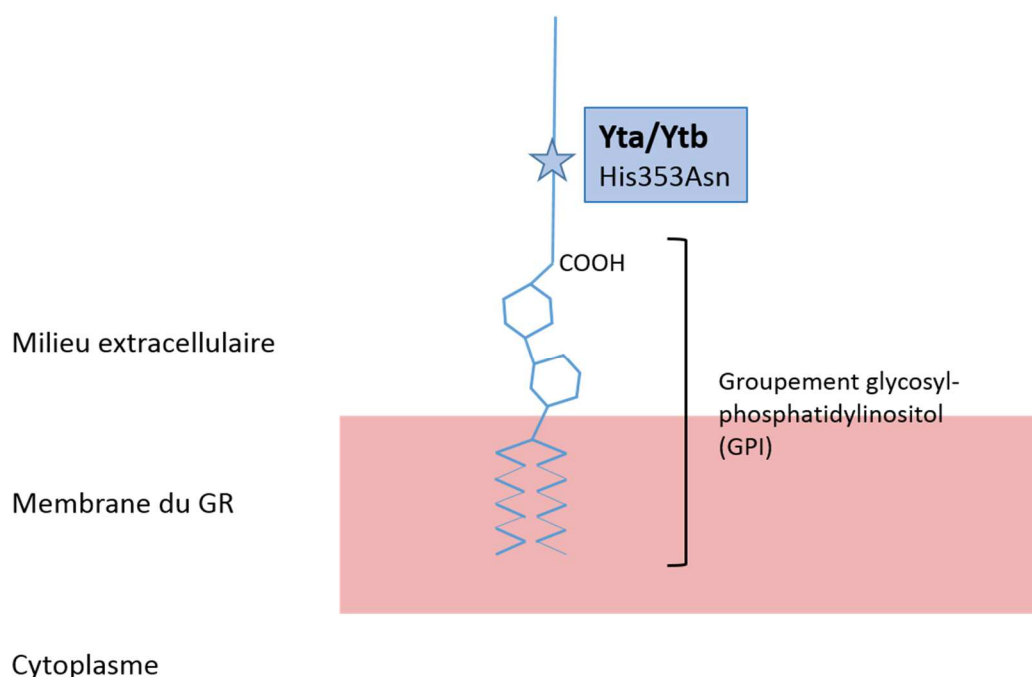


Figure 7. Schéma de la protéine AChE et localisation du polymorphisme faux-sens responsable des antigènes du système YT.

b. Antigènes et anticorps

Le système Cartwright est constitué de deux antigènes antithétiques : Yt^a et Yt^b. L'antigène Yt^a et son anticorps associé ont été décrits pour la première fois en 1956 chez une patiente allo-immunisée par grossesse et/ou transfusion [46], l'antigène Yt^b n'a, quant à lui, été identifié qu'en 1964 [47]. Dans les populations d'Europe de l'Ouest, Canadiennes et Afro-américaines, l'antigène Yt^a est un antigène public avec une fréquence de 99.7%, alors que l'antigène Yt^b n'est présent que chez 8 % des individus. La fréquence du phénotype Yt(a-b+) est de 0.3% dans la population européenne. En revanche en Israël l'antigène Yt^b a une fréquence de plus de 20%, ce qui implique une fréquence des phénotypes Yt(a+b+) et Yt(a-b+) beaucoup plus élevée que dans les populations d'Europe de l'Ouest [21].

Les anticorps anti-Yt^a et anti-Yt^b sont des IgG d'origine transfusionnelle ou apparaissent après une grossesse incompatible. Aucun cas de MHFNN n'a été rapporté à ce jour. Bien que le phénotype (Yt(a-b+)) soit rare, de nombreux anti-Yt^a ont été décrits. La fréquence de cet anticorps est plus élevée dans les populations d'origine israélienne. L'anti-Yt^a n'est, en général, pas responsable de réaction transfusionnelle bien que quelques réactions retardées aient été décrites [48]. Cependant, cet anticorps entraîne une panagglutination (agglutination de la totalité des hématies du panel lorsqu'elles sont mises en présence du sérum du patient) avec la plupart des panels d'hématies utilisés dans la recherche d'agglutinines irrégulières dans les laboratoires d'IHR. La présence d'un anti-Yt^a peut donc masquer d'autres anticorps dangereux lors d'une transfusion ou d'une grossesse. Il est important d'identifier l'anticorps anti-public responsable de la panagglutination, afin de connaître sa dangerosité. L'anti-Yt^a est un des anticorps anti-publics le plus fréquemment observés dans les laboratoires d'IHR. La recherche du phénotype Yt chez les patients présentant une panagglutination est donc très utile.

L'anti-Yt^b est quant à lui rare, et il est généralement mis en évidence à l'occasion d'une poly-immunisation.

B. Système Vel (ISBT 034)

a. *Protéine et bases moléculaires.*

L'antigène Vel est porté par la protéine transmembranaire de type II SMIM1 (*Small integral membrane protein 1*) (**Figure 8.**). Cette protéine de 78 aa est codée par le gène *SMIM1* [49]. Ce gène, qui couvre 3.2 kb, est composé de quatre exons et est situé à l'extrémité du bras court du chromosome 1, à proximité du locus *RH*.

Une seule base moléculaire du phénotype Vel négatif est décrite. Il s'agit d'une délétion de 17 pb dans l'exon 3 du gène *SMIM1* (c.64_80del17) induisant un décalage du cadre de lecture au début de la traduction et donc l'absence de la protéine à la surface des GRs [50-52].

La fonction de la protéine SMIM1 est encore inconnue. Cependant, la conservation de cette protéine à travers les espèces suggère un rôle important.

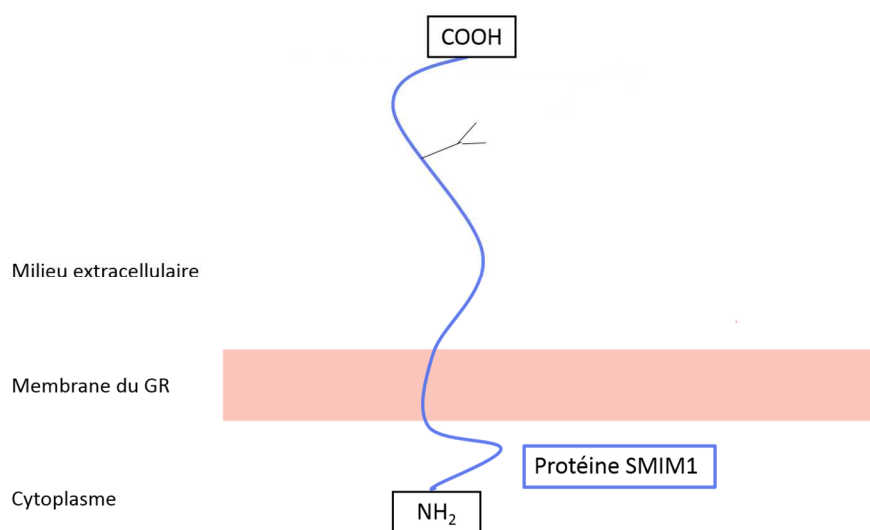


Figure 8. Schéma de la protéine SMIM1.

b. *Antigène et phénotypes Vel-négatif et Vel faible.*

Le système VEL est constitué d'un seul antigène (Vel) exprimé chez plus de 99.9% de la population et considéré comme un antigène public. Le phénotype Vel-négatif est donc un phénotype rare dont la fréquence est de 1/4.000 en Europe de l'Ouest avec une prévalence plus élevée en Scandinavie qui atteint 1/1.200 chez les donneurs de sang suédois [53]. Les phénotypes Vel faibles résultent de plusieurs mécanismes. Le

plus courant est la présence de la délétion c.67_80del17 à l'état hétérozygote [54]. Quatre polymorphismes simples dans l'exon 4 sont également associés à ce phénotype. Deux d'entre eux affectent la méthionine en position 51 et lui substituent soit une lysine (c.152T>A), soit une arginine (c.152T>G) [52]. Un troisième affecte la leucine en position 54 et lui substitue une proline (c.161T>C). Le dernier entraîne la substitution de l'arginine en position 41 par une lysine (c.122G>A) [55]. Plusieurs polymorphisme dans l'intron 2 affecteraient également l'expression de Vel [54, 56].

La détermination du phénotype Vel était impossible dans les laboratoires d'IHR jusqu'en 2015, en raison de l'absence de réactifs spécifiques. Les bases moléculaires du système n'ont quant à elles été décrites que très récemment (2013) [50, 51].

c. Anticorps

Les anticorps anti-Vel sont le plus souvent de nature IgM, et plus rarement ce sont des IgG. Une allo-immunisation avec production d'un anticorps anti-VEL sérique peut conduire à des chocs transfusionnels gravissimes, il est donc cliniquement important. Les patients de phénotype Vel-négatif nécessitent donc en cas de transfusion, des CGRs de phénotype Vel-négatif. Dans le cadre d'une grossesse, cet anticorps peut causer un ictère néonatal plus ou moins sévère, en particulier s'il est de type IgG.

II. OBJECTIFS

Chez les patients, la détermination du phénotype érythrocytaire des systèmes de groupe sanguin est classiquement réalisée, au sein des laboratoires IHR, par la technique d'hémagglutination. Cependant, cette technique est inadaptée dans le cas d'un test de Coombs direct positif ou chez les patients récemment transfusés. Par ailleurs, certains antigènes sont impossibles à détecter par hémagglutination en raison de l'absence de réactifs spécifiques (antigènes Vel, Yta, Ytb, Jsa, Js_b...). Enfin, les techniques immuno-hématologiques ne permettent pas dans la majorité des cas de détecter et/ou de distinguer des variants faibles et partiels. Ainsi, pour pallier aux limites de l'hémagglutination et permettre une meilleure prise en charge des patients que ce soit dans le cadre d'une transfusion ou d'une grossesse, la description moléculaire des allèles codant les antigènes de groupes sanguins érythrocytaires est primordiale.

Mon travail s'articule autour de deux axes. Le premier est l'étude moléculaire des ambiguïtés phénotypiques des systèmes de groupe sanguin immunogènes (RH et KEL) qui peuvent être responsables de situations cliniques potentiellement dangereuses pour les patients dans le cadre de transfusion incompatible ou de grossesse. Les données moléculaires ont été obtenues grâce à des outils de génotypage commerciaux et à l'aide de séquençage. Pour compléter la caractérisation des nouveaux variants identifiés dans ce travail, nous avons utilisé la cytométrie en flux et/ou l'hémagglutination pour l'analyse du système RH, et la modélisation 3D en collaboration avec l'UMR7590 (université Pierre et Marie Curie, Paris 6), pour le système KEL.

Le second axe est la mise en place d'outils moléculaires pour prédire l'expression des antigènes privés/publics. Je me suis intéressée au phénotype Vel-négatif en raison de la dangerosité des immunisations anti-Vel. En effet, il est indispensable d'identifier les patients présentant le phénotype rare Vel-négatif et, au moment où cette étude a été initiée, aucun anticorps anti-Vel ne permettait la détection de ce phénotype et les outils de génotypage commercialisés ne proposaient pas sa détection. J'ai donc mis au point une technique de génotypage compatible avec les contraintes des laboratoires d'IHR. Enfin, toujours en raison de l'absence d'outils pour identifier l'antigène Yt^a, j'ai développé un test moléculaire destiné à identifier les allèles *YT*01* et *YT*02*. En effet, bien que l'anti-Yt^a ne soit pas responsable, en général, de réactions

transfusionnelles, son identification reste importante. Cet anticorps anti-public, est souvent retrouvé dans les laboratoires d'IHR. Ainsi son identification permet d'exclure la présence d'autres anticorps anti-publics qui pourraient être dangereux.

Ce travail s'inscrit dans le développement, l'amélioration des techniques et des connaissances au sein d'un laboratoire d'IHR afin de pallier aux limites de l'immuno-hématologie (panels inadaptés, phénotypage impossible...)

III. MATERIELS ET METHODES

1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique (ADNg) est réalisée à partir de 200µL de sang total, prélevé sur EDTA. Ces prélèvements sanguins nous sont adressés par le laboratoire d'IHR de l'EFS-AM pour la réalisation du génotypage érythrocytaire. L'extraction est réalisée à l'aide de l'automate QIACUBE (Qiagen) en utilisant le kit QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen) en suivant la notice du fournisseur. Ce kit est basé sur l'adsorption sélective des ADNg sur une matrice de silice. Les ADNg sont élués dans de l'eau. La mesure de la concentration de l'ADNg est réalisée par spectrophotométrie sur un Nanodrop 2000.

2. Génotypage BioArray

La recherche des variants du gène *RHD*, du gène *RHCE* et le génotypage étendu sont réalisés par la technique eMAP® à l'aide des kits BioArray RHD Beadchip, BioArray RHCE Beadchip et BioArray HEA Beadchip (Immucor). Le kit RHD détecte 35 marqueurs génétiques et il permet d'identifier 68 variants du *RHD*, et le kit RHCE détecte 13 marqueurs génétiques et permet d'identifier 48 variants du *RHCE*. Le kit HEA permet de détecter 24 polymorphismes de groupes sanguins érythrocytaires visant à déterminer les phénotypes déduits des génotypes dans les systèmes de groupe sanguin Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton, Scianna. Ce test détecte également une mutation qui détermine le statut de l'hémoglobine S mutée chez les patients drépanocytaires.

Principe : Cette technique se déroule en plusieurs étapes, la première est une PCR multiplexée réalisée à l'aide de couples d'amorces dont l'une est phosphorylée en 5'. La deuxième étape est une étape de purification de la réaction de PCR par un mélange d'exonucléase-I (exo-I), et de phosphatase alcaline de crevette (SAP, *Shrimp alkaline phosphatase*) qui dégradent les amorces résiduelles et les dNTP résiduels. La troisième étape consiste à générer un simple brin d'ADN grâce à une lambda

exonucléase qui va dégrader le brin phosphorylé. Enfin, la dernière étape permet l'hybridation du simple brin sur une puce qui comporte des billes colorées sur lesquelles sont greffées des sondes spécifiques des SNP d'intérêt, à chaque couleur correspond une sonde. Cette étape d'hybridation est réalisée dans une chambre humide à une température contrôlée de 55°C en présence d'une ADN polymérase, de dCTP-TAMRA et de dNTP. Lorsque l'hybridation est parfaite entre l'amplicon simple brin et la sonde portée par la bille colorée, l'élongation va permettre l'incorporation de dCTP-TAMRA. En l'absence d'hybridation complète il n'y a pas d'élongation. Après lavage, la puce est soumise à une optique de fluorescence associée à une caméra pour visualiser les billes marquées par le dCTP-TAMRA et mesurer l'intensité du signal. La lecture est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence en superposant les images de codage des billes colorées avec celles de la fluorescence associée pour chaque bille (**Figure 9.**), le logiciel BASIS interprète les données de fluorescence et permet, pour chaque SNP, de définir des génotypes homozygotes sauvage (AA), homozygotes muté (BB), ou hétérozygote (AB).

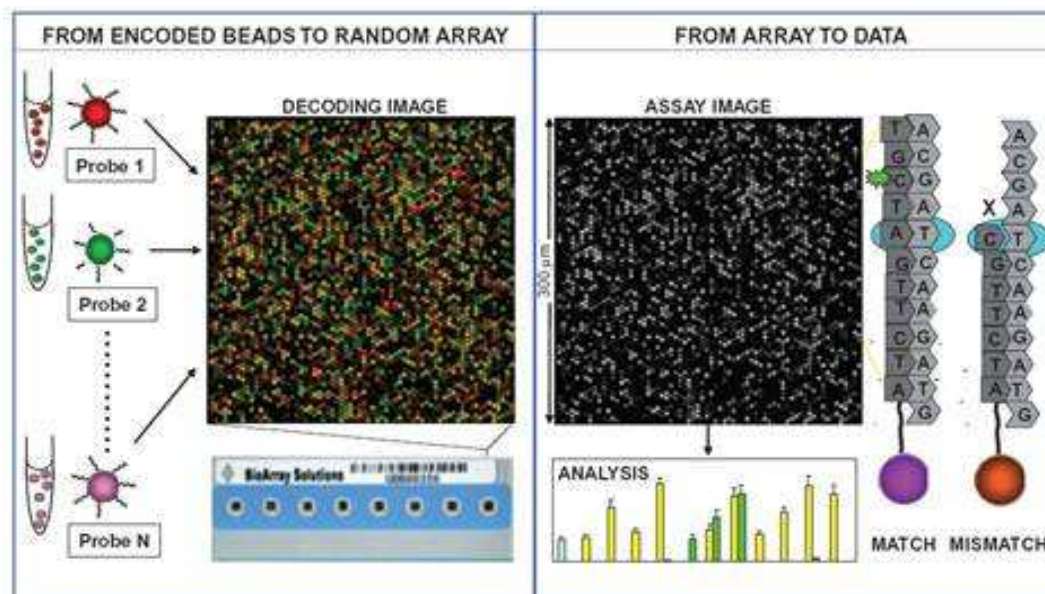


Figure 9. Lecture des puces Bioarray par superposition des images de codages des billes colorées (à gauche) avec les images de fluorescence obtenues (à droite)

Réalisation : Quel que soit le kit utilisé (BioArray RHD Beadchip, BioArray RHCE Beadchip ou BioArray HEA Beadchip) la PCR multiplex est réalisée en présence de 16 μL du mix de PCR spécifique, 1 μL de Taq polymérase hot star et 8 μL d'ADNg dont la concentration est comprise entre 10 et 80 ng/ μL . L'amplification est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem).

Etapes des techniques Bioarray RHD et RHCE Beadchip : Le protocole est identique pour les kits BioArray RHD Beadchip et BioArray RHCE Beadchip. Le programme de PCR commence par une étape de dénaturation initiale avec activation de la polymérase à 95°C pendant 15 minutes. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplifications composés comme suit : [95°C, 30 sec - 65°C, 45 sec - à 72°C, 45 sec] 10 cycles, [95°C, 30 sec - 61°C, 45 sec - 72°C, 45 sec] 25 cycles. La purification de 6,5 μL de produit de PCR est réalisée en présence de 2 μL de réactif cleanup (exo-I + SAP) pendant 15 min à 37°C, puis 20 min à 85°C pour inactiver les enzymes. Le simple brin est ensuite généré par ajout de 2 μL de lambda exonucléase pendant 20 min à 37°C. L'enzyme est inhibée par incubation 8 min à 85°C. Enfin, l'étape d'hybridation/élongation est réalisée en ajoutant 10 μL du mix d'élongation eMAP au produit de PCR simple brin. Un volume de 18 μL de ce mélange est ensuite déposé sur une puce qui est ensuite incubée 30 min à 55°C dans une atmosphère humide. Après lavage et lecture des puces les résultats sont interprétés *via* le logiciel BASIS.

Etapes des techniques BioArray HEA Beadchip : Le programme de PCR commence par une dénaturation initiale avec activation de la polymérase à 94°C pendant 15 minutes. Cette étape est suivie de 30 cycles d'amplifications [94°C, 30 sec - 60°C, 30 sec - 68°C, 50 sec] puis 1 dernier cycle à 68°C pendant 8 min. La purification de 6,5 μL de produit de PCR est réalisée en présence de 2 μL de réactif cleanup (exo-I + SAP) pendant 25 min à 37°C, puis 15 min à 80°C pour inactiver les enzymes. Le simple brin est ensuite généré par ajout de 2 μL de lambda exonucléase pendant 25 min à 37°C. L'enzyme est inhibée par incubation 15 min à 80°C. L'étape d'hybridation/élongation est réalisée en ajoutant 10 μL du mix d'élongation eMAP au produit de PCR simple brin, puis 15 μL de ce mélange sont déposés sur une puce qui est ensuite incubée 30 min à 53°C dans une atmosphère humide. Après lavage et lecture des puces les résultats sont interprétés *via* le logiciel BASIS.

3. Amplification et séquençage du gène *RHD*, *RHCE* et *KEL*

Les PCR des 10 exons des gènes *RHD* et *RHCE* et des 19 exons du gène *KEL* sont réalisés par « Touch-down PCR » avec 100 ng d'ADN dans un volume final de 50 µL. Ce volume contient 5 µL de tampon de PCR, 2 mM de MgCl₂, 80 ng de BSA (albumine sérique bovine), 0.2 mM de dNTP, 0.05 U de Taq polymérase (Invitrogen) et 200 mM de chaque amorce (les séquences des amorces sont listées en annexe 2 et 3). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur Biometra T1 (LABGENE Scientific Instruments). Le programme de PCR est constitué de 42 cycles répartis comme suit : pendant les 12 premiers cycles la température d'hybridation (T) décroît de 66°C à 60°C tous les 2 cycles, [94°C, 30 sec – T°C, 30 sec - 72°C, 1 min] les 30 derniers cycles sont ensuite réalisés à une température d'hybridation de 60°C [94°C, 30 sec - 60°C, 30 sec - 72°C, 1 min].

Après l'amplification les produits de PCR sont contrôlés par migrations sur gel d'agarose à 2 % en présence d'un intercalant de l'ADN (SightDNA stain, Euromedex). Les produits de PCR sont ensuite séquencés suivant la technique de Sanger *via* le prestataire GATC (Konstanz, Allemagne).

4. Discrimination allélique utilisant des sondes d'hydrolyse (Technique TaqMan)

Cette technique permet de déterminer le ou les allèle(s) présent(s) dans un échantillon grâce en une amplification unique. Ainsi, la PCR est réalisée en présence d'un couple d'amorce qui encadre le polymorphisme d'intérêt et deux sondes marquées par des fluorochromes différents, chaque sonde étant spécifique d'un allèle. Les sondes comportent à leur extrémité 5' un fluorochrome : le « reporter » et à leur extrémité 3' un suppresseur : le « quencher » liés de façon covalente. Lorsque les sondes sont intactes, la proximité du quencher et du reporter est telle que la fluorescence du reporter n'est pas détectable (elle est « quenchée »). Les amorces et les sondes vont lier spécifiquement leurs séquences cibles pendant la phase d'hybridation. Pendant la phase d'élongation la Taq polymérase, grâce à son activité exonucléase 5'–3', va dégrader les sondes hybridées ce qui entraîne l'éloignement du reporter de son quencher. Ainsi la fluorescence émise par le reporter

va pouvoir être détectée. On pourra donc, à la fin de la PCR, identifier la présence ou non de l'allèle RN ou de l'allèle responsable de l'antigène Vel négatif, en fonction des fluorescences détectées.

A. Détection de *RHCE*RN*

Le test de détection de l'allèle *RHCE*CeRN* utilisé a été développé par Christophe Tournamille [57]. Ce test est réalisé avec deux sondes à hydrolyse MGB (*Minor Groove Binding*) : une sonde, spécifique de l'exon 4 du *RHCE* allèle sauvage (absence d'allèle *RHCE*CeRN*) qui est marquée par du VIC et une deuxième sonde, spécifique de l'exon 4 du *RHD* (allèle *RHCE*CeRN*) qui est marquée par du FAM (6-carboxyfluorescein).

La PCR est réalisée sur 50 ng d'ADNg, le volume final est de 25 µL. Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), de 900nM de chaque amorce et 100nM de chaque sonde. Le programme de PCR est réalisé sur l'appareil Biorad CFX96 Real Time System-C1000 Thermal Cycler : 1 cycle de dénaturation et d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min, suivi de 43 cycles de PCR [95°C, 30 sec - 56°C, 30 sec - 72°C, 30 sec]. Pour déterminer le génotype d'un échantillon il est indispensable d'utiliser des témoins de génotype connu : un témoin homozygote pour l'allèle *RHCE*CeRN*, un témoin homozygote pour l'allèle sauvage *RHCE*, un témoin hétérozygote, et enfin un témoin négatif pour vérifier l'absence de contamination (pas d'ADN).

B. Détection des allèles responsables de phénotype prédit Vel+ et Vel-

J'ai dessiné les amorces et les sondes en utilisant le logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), les séquences ont ensuite été comparées aux bases de données pour vérifier leur spécificité (BLASTn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La sonde qui permet de détecter l'allèle codant le phénotype Vel-positif (allèle sauvage) est marquée par du Yakima Yellow (YY) et est positionnée sur la séquence de 17 pb spécifique à cet allèle. La sonde qui détecte l'allèle codant le phénotype Vel- (c.64_80del17) est marquée avec du FAM (Carboxyfluorescein) et est localisée sur le chevauchement de la jonction après délétion (voir **Figure 10**).

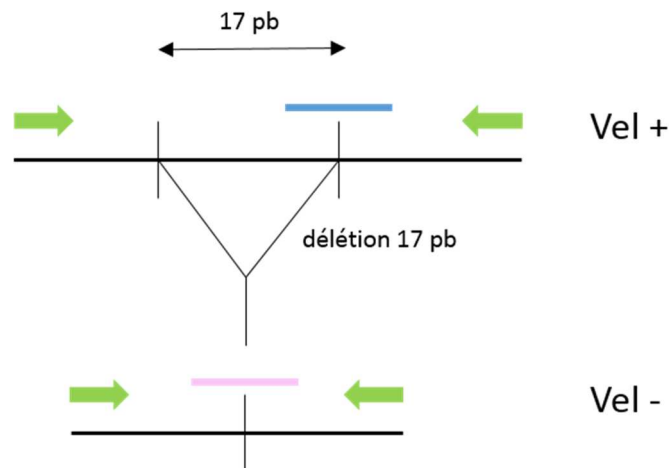


Figure 10. Positionnement des amorces et des sondes utilisées pour la discrimination allélique du phénotype déduit Vel. Les amorces sont représentées par des flèches vertes. La sonde spécifique à l'allèle sauvage est en bleu et la sonde spécifique à l'allèle Vel-négatif (c.64_80del17) est en rose.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur Biorad CFX96 Real Time System-C1000 sur 100 ng d'ADNg dans un volume final de 25 μ L. Le mélange réactionnel contient 12,5 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300nM de chaque amorce (VEL_ex3_S : CTG-GCC-ACC-TGT-CTT-GAT-CT, VEL_ex3_AS : GTC-TCT-GGA-GGG-AGA-CAC-CA) et 200nM de chaque sonde (YY_VEL+ : AGG-GGC-TGT-GTC-CAG-CA, FAM_VEL- : AGG-GAC-GGA-GTC-CAG-CA). Le programme de PCR est composé d'un cycle de dénaturation et d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min, suivi de 45 cycles de PCR [95°C, 10 sec - 60°C, 30 sec - 72°C, 30 sec]. Dans chaque test des échantillons connus sont inclus (un homozygote sauvage Vel+/Vel+, un hétérozygote Vel+/Vel-, un homozygote Vel-/Vel-) ainsi qu'un témoin négatif pour vérifier l'absence de contamination. Ils permettent l'interprétation des résultats du génotype.

5. Détection des allèles *YT*01* et *YT*02* par PCR allèle spécifique.

Deux PCR ont été développées, l'une pour détecter l'allèle *YT*01*, et l'autre l'allèle *YT*02*. Pour interpréter les résultats négatifs, j'ai inclus dans chaque PCR un contrôle interne (amplification de l'exon 4 du gène *RHCE*) qui attestera de la réalisation correcte

de la PCR. Comme précédemment j'ai dessiné les amorces en utilisant le logiciel Primer3 et les ai comparées aux bases de données.

L'amorce spécifique de *YT*01* et celle spécifique de *YT*02* sont des amorces anti-sens positionnées sur le polymorphisme 1057C>A dans l'exon 2 de *AChE*. Leurs séquences sont 5'-TAG-TTA-CCT-GTA-GGC-TGT-G-3' et 5'-CTA-GTT-ACC-TGT-AGG-CTG-TT-3' respectivement. L'amorce sens est commune aux deux amplifications (5'-GCA-ATG-TGG-GTC-TCC-TGG-AT-3'). Des mésappariements ont été introduits au sein des séquences des amorces (en vert) pour gagner en spécificité.

Les amorces du témoin interne (exon 4 *RHCE*) sont données en annexe.

Chacune des deux amplifications est réalisée sur 100 ng d'ADN dans un volume final de 20 µL, en présence de 12.5 µL de PCR master mix (1.25X) (Qiagen Multiplex PCR Kit), de 2.5 µL de solution Q (0.6X), de 300nM de chaque amorce *AChE*. Et de 200nM des amorces *RHCE*. Ces amplifications sont réalisées sur un thermocycleur Biometra T1 (LABGENE Scientific Instruments) en utilisant un programme qui comprend une étape d'activation à 94°C pendant 15 min, suivi de 45 cycles [94°C, 30 sec - 58°C, 30 sec - 72°C, 30 sec]. A la fin de ces amplifications, les amplicons sont visualisés par migration sur gel d'agarose à 2% en présence de Sight DNA Stain (Euromedex). Les bandes de 111pb témoignent de la présence des allèles *YT*01* et/ou *YT*02* tandis que les bandes de 762 pb, qui correspondent au témoin interne, et indiquent que le résultat du test est valide.

6. Cytométrie en flux

La Cytométrie en flux nous permet de quantifier le nombre de sites antigéniques sur les GRs dans nos échantillons. Deux témoins sont inclus dans chaque expérience : un témoin négatif d/d (qui n'exprime pas de protéine RhD) et un témoin D positif qui exprime un nombre connu de sites antigéniques. Pour chaque échantillon quatre marquages sont réalisés avec des anticorps monoclonaux humains anti-D qui ciblent différents épitopes de la protéine RhD (**Tableau IV.**).

Tableau IV. Anticorps anti-RhD utilisés pour la cytométrie en flux

Clone	Epitope [24]	Dilution finale
P3X249	2.1	1/2
LHM76/55	3.1	1/40
P3X241	5.4	1/2
LHM169/80	6.3	1/40

Chaque marquage est réalisé sur 1×10^6 GRs. Les GRs sont lavées trois fois en PBS 0.2 % BSA filtré (centrifugation : 5 min, 300 g, 4°C) puis incubées 1 heure à température ambiante dans un volume final de 200 μ L avec l'anticorps monoclonal dilué en PBS 0.2% BSA. Après trois lavages en PBS 0.2% BSA, les cellules sont incubées deux heures dans de la glace à l'abri de la lumière en présence d'anticorps Fab anti-IgG humaine couplé au FITC (Jackson). Après trois derniers lavages en PBS 0.2% BSA, les GRs sont resuspendus dans du PBS et analysés sur le cytomètre MacsQUANT™ Analyser (Miltyeni Biotech).

7. Détermination du phénotype RH.

Le phénotype des échantillons est réalisé par les différents laboratoires d'IHR. Les différentes techniques d'héماغglutination utilisées sont :

- la technique en microplaque utilisant l'E.M. Technology (Erythrocytes Magnetized Technology) basé sur la magnétisation des hématies
- la technique en gel filtration qui utilise des cassettes qui contiennent des micro-billes ou du gel et l'anti-sérum spécifique de l'antigène à rechercher,
- la technique d'héماغglutination en tube salin qui consiste à mettre en contact l'antisérum avec les globules rouges dilués du patient.

Les résultats des intensités de ces techniques sont quantifiés par lecture à l'œil ou à l'aide d'un logiciel et rendu de l'intensité la moins forte : (+) ou ? à la plus forte 4+, les doubles populations, souvent expliquées par des transfusions, sont notifiées : DP.

IV. RESULTATS

1. Etude moléculaire des patients présentant une ambiguïté phénotypique au sein du système RH.

A. Ambiguïté du phénotype RhD et détection des variants

Entre octobre 2014 et décembre 2016, 461 échantillons présentant une ambiguïté phénotypique RhD nous ont été adressés. En première intention, nous avons réalisé le génotypage *RHD* par la technique de Bioarray. Si cette technique ne permettait pas d'expliquer l'ambiguïté nous avons réalisé le séquençage des 10 exons du gène.

a. *Technique de première intention : Bioarray RHD*

Dans 420/461 prélèvements (91.1%) la technique de première intention Bioarray RHD a permis d'identifier les variants du gène *RHD* à la base de l'ambiguïté (**Figure 11.**). Dans 63.3% des échantillons, un variant de D faible type 1, D faible type 2 ou D faible type 3 a été détecté.

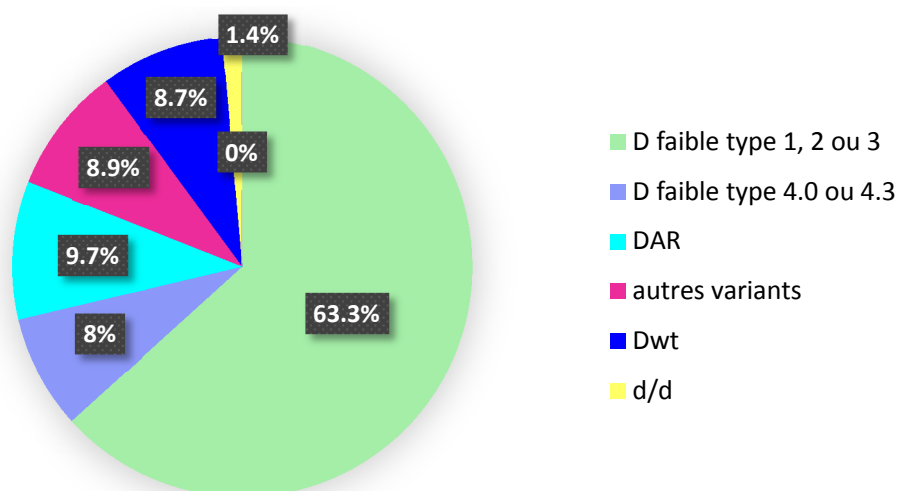


Figure 11. Variants du gène *RHD* identifiés sur 461 échantillons analysés entre octobre 2014 et décembre 2016.

D'autres allèles sont observés à des fréquences proches de 10%, comme les allèles codant les phénotypes DAR (9.7%) et D faible type 4.0 ou 4.3 (8%). Enfin, plusieurs autres allèles *RHD* déjà décrits sont observés à des fréquences très faibles dans les 41 échantillons (8.9 %), par exemple 13 D faible type 11, six *RHD*DFR2*, deux *RHD*DAU2*, deux *RHD*DVI type 2* (les variants retrouvés sont listés en Annexe 4). Tous ces allèles sont observés à l'état homo- ou hémizygote. Il faut noter que l'analyse BioArray a montré une délétion du gène *RHD*, chez un patient qui est donc de phénotype RhD-négatif. Dans ce cas l'ambiguïté observée par les techniques d'immuno-hématologie pourrait être liée, soit à un problème de réactif, soit à la qualité du prélèvement.

Enfin chez 8.7% (n=40) des patients, l'analyse de première intention n'identifie aucun polymorphisme, le logiciel interprète les résultats comme possible D sauvage (Dwt). En raison de l'ambiguïté du phénotype, nous avons approfondi l'étude de ces échantillons en séquençant l'ensemble des séquences codantes du gène *RHD*.

En raison de la transmission sous forme d'haplotype de certains variants *RHD* et *RHCE*, l'exploration du *RHCE* a été réalisée pour certains patients. Cela a par exemple été le cas pour les 44 échantillons homo- ou hémizygotes pour l'allèle *RHD*DAR*. L'exploration du *RHCE* a permis de retrouver 38 allèles *RHCE*ceAR*, deux allèles *RHCE*ce*, et quatre allèles *RHCE*ceEK*.

b. Identification caractérisation des nouveaux variants du RHD

Lorsque le résultat de l'analyse de première intention ne permet pas d'identifier le variant, le séquençage des 10 exons du *RHD* a été réalisé. Cette approche de deuxième intention a permis d'identifier des variants du *RHD* déjà décrits mais non recherchés par la technique Bioarray, nous avons ainsi identifié sept *RHD*D faible type 10*, cinq *RHD*D faible type 18*, deux *RHD*D faible type 25*... (la liste des 30 variants déjà décrits retrouvés au séquençage est donnée en Annexe 4). Nous avons également identifié dix nouveaux allèles variants du *RHD* que nous avons caractérisé (**Tableau V.**).

Sept nouveaux allèles présentent un polymorphisme faux-sens dans les régions codantes du gène *RHD* : 73A>T (Ile25Phe) dans l'exon 1 ; 143A>G (Tyr48Cys) dans l'exon 1 ; 605C>A (Ala202Glu) dans l'exon 4 ; 626 C>T (Ala209Val) dans l'exon 4 ;

668T>C (Phe223Ser) dans l'exon 5 ; 761C>G (Ser254X) dans l'exon 5 ; et 1229T>C (Phe410Ser) dans l'exon 10.

Deux autres échantillons présentent deux SNPs, le premier dans les exons 1 et 9 : 105C>G, 1195G>A (Asp35Glu, Ala399Thr) ; et le second dans l'exon 9 : 1170T>C, 1193A>T (Leu390Leu, Glu398Val).

Enfin nous avons identifié un dernier polymorphisme dans la région non codante du gène *RHD* : IVS2-3c>t susceptible d'affecter l'épissage (voir discussion).

Ces nouveaux allèles sont observés à l'état homozygote ou hémizygote, à l'exception de l'allèle *RHD***RHD*(I25F) qui présente un allèle silencieux *RHD***RHD**psi* en *trans*. L'ensemble des SNP exoniques affectent des acides aminés localisés soit dans les domaines transmembranaires (M0 à M11), soit dans des boucles intracellulaires (ICL1 à ICL7) du polypeptide RhD [58].

Une étude *in silico* a été réalisée grâce au logiciel Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) qui prédit dans quelle mesure un changement d'acide aminé peut affecter la stabilité d'une protéine (**Tableau V**). Cette analyse révèle que, pour trois des nouveaux variants, les polymorphismes ne devraient pas affecter la stabilité de la protéine (assignés *Benign*) et devraient de fait avoir un effet modéré sur le nombre de sites antigéniques. Les autres polymorphismes considérés comme *Probably Damaging* sont susceptibles d'affecter fortement la stabilité du polypeptide RhD.

L'affaiblissement d'expression a également été évalué par les analyses en cytométrie de flux qui ont permis d'estimer le nombre de sites antigéniques par GR en utilisant quatre anticorps ciblant différents épitopes (l'exemple du variant *RHD*(I25F) est donné dans la **Figure 12.**). Le nombre de sites calculé avec les différents anticorps étant similaire, nous avons retenu la moyenne pour chaque échantillon (**Tableau V**). On observe ainsi une grande variabilité du nombre de sites antigéniques moyen suivant l'allèle concerné (de 209 à 11.910 sites/GR)

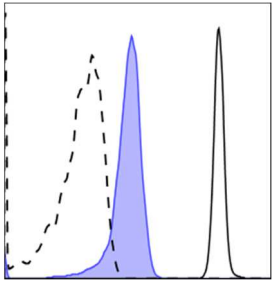
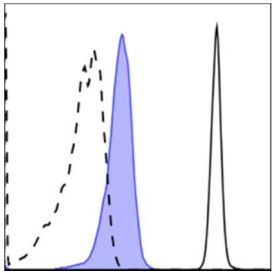
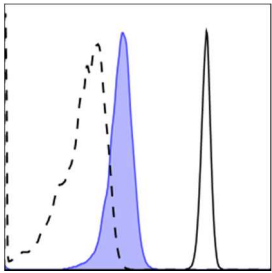
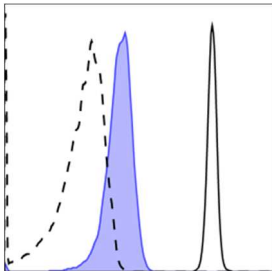
Clones	Epitopes	Cytométrie de flux	Densité des épitopes D*	Densité moyenne des épitopes D**
P3X249	2.1		683	
LHM76/55	3.1		498	648
P3X241	5.4		799	
LHM169/80	6.3		612	

Figure 12. Résultat de la cytométrie de flux du variants *RHD(I25F)*. * Densité des épitopes D/GR pour chacun des clones ; ** Densité moyenne des épitopes D/GR des analyses réalisées avec les clones : P3X249, LHM76/55, P3X241, LHM169/80.

Tableau V. Caractérisation des dix nouveaux variants *RHD*

Allèle	Polymorphisme	Exon	Changement d'acide aminé	Localisation [58]	Prédiction Polyphen*	Phénotype RhCE	Densité épitopes [#]
<i>RHD(I25F)</i>	73A>T	1	Ile25Phe	M0	B [0.108, 0.91, 0.69]	C-E-c+e+	648
<i>RHD(D35E,A399T)</i>	105C>G	1	Asp35Glu	M0	B [0.416, 0.84, .079]	C+E-c+e+	8804
	1195G>A	9	Ala399Thr	ICL7	B [0.065, 0.92, 0.65]		
<i>RHD(Y48C)</i>	143A>G	1	Tyr48Cys	M1	PD [0.992, 0.49, 0.95]	C-E+c+e+	468
<i>RHD(A202E)</i>	605C>A	4	Ala202Glu	ICL4/M6	PD [0.811, 0.75, 0.87]	C-E-c+e+	843
<i>RHD(A209V)</i>	626C>T	4	Ala209Val	M6	PD [0.909, 0.69, 0.90]	C+E-c-e+	209
<i>RHD(F223S)</i>	668T>C	5	Phe223Ser	M6	PD [0.87, 0.72, 0.89]	C-E-c+e+	450
<i>RHD(S254X)</i>	761C>G	5	Ser254X	M7	so	C+E-c-e+	NR
<i>RHD(E398V)</i>	1170T>C	9	Leu390Leu	ICL7	so	C+E-c+e+	7280
	1193A>T	9	Glu398Val	ICL7	B [0.001, 0.99, 0.01]		
<i>RHD(F410S)</i>	1229T>C	10	Phe410Ser	ICL7	PD [0.965, 0.62, 0.93]	C+E-c+e+	708
<i>RHD(IVS2-3c>t)</i>	-3c>t	Intron 2	so	so	so	C+E-c+e+	11910

NR : Non réalisé ; so : sans objet ; M : domaine membranaire ; ICL : domaine intracellulaire ; * [score, sensibilité, spécificité], PD: *Probably Damaging*, B: *Benign* ; [#] densité moyenne

B. Ambigüité du phénotype RhCE et détection des variants

Entre octobre 2014 et décembre 2016, 201 échantillons présentant une ambigüité phénotypique du RhCE nous ont été adressés. Les techniques mises en œuvre ont été adaptées en fonction de l'antigène affaibli, au regard de la fréquence des variants et du coût des analyses (**Tableau VI.**).

Tableau VI. Nombre d'échantillons réceptionnés et techniques utilisées en fonction de l'antigène en ambigüité.

Antigène en ambigüité	n=	1 ^{ère} intention	2 ^{ème} intention	3 ^{ème} intention
RhC ou RhC et Rhe	102	Rech. du <i>RHCE*CeRN</i>	Bioarray RHCE	Séquençage
Rhe	49	Rech. du <i>RHCE*CeRN</i>	Bioarray RHCE	Séquençage
Rhc	18	Bioarray RHCE	Séquençage	
RhE	32	Bioarray RHCE	Séquençage	

Rech. : Recherche

a. *Ambigüité du phénotype RhC ou RhC et Rhe*

Dans le cas d'une ambigüité du phénotype de l'antigène RhC ou d'une ambigüité simultanée des antigènes RhC et Rhe, le variant *RHCE*CeRN* est recherché en première intention. Ce variant est recherché par discrimination allélique dans 102 échantillons de patients (**Figure 13.**). Dans le cas où ce variant n'est pas retrouvé, et pour expliquer l'ambigüité du phénotype, les échantillons sont génotypés par la technique Bioarray.

- 39 échantillons (38.2%) sont porteurs de l'allèle *RHCE*CeRN* dont deux à l'état homozygote.

- dans 44 des 63 échantillons restants nous avons pu corréliser les données du phénotype à la présence d'allèles et/ou d'haplotypes particuliers par la technique Bioarray :

- nous avons identifié 18 allèles *RHCE*C* variants, comme par exemple : *CeVA* (n=4), *CeMA*, n=3 ou haplotypes *RHD/RHCE (C)ces type 2*, n=3 (les variant retrouvés sont listés en Annexe 5).

- Pour 26 patients, les résultats du génotypage suggèrent la présence d'un allèle *RHCE*CE* connu pour être associé à un affaiblissement de l'antigène C.

- Enfin pour les 19 échantillons restants :

- aucun allèle *RHCE*C* n'est mis en évidence (absence de l'insertion de 109 pb dans l'intron 2 et absence des polymorphismes dans l'exon 2) et aucune investigation n'a été réalisée, c'est le cas pour 10 échantillons
- soit un allèle *RHCE*Ce* est détecté mais aucun variant n'est identifié par le test (n=9). Une étude par séquençage des 10 exons du gène *RHCE* a été réalisée pour ces 9 échantillons.

b. Ambiguïté du phénotype Rhe

Les 49 échantillons présentant une ambiguïté du Rhe ont été investigués pour la présence du variant *RHCE*CeRN* (**Figure 13.**). Cinq patients présentaient cet allèle en *trans* d'un allèle *RHCE*CE* et un était *RHCE*CeRN* homozygote, ce dernier exprimant le phénotype rare RH :-46.

L'analyse des 43 échantillons négatifs pour l'allèle *RHCE*CeRN* sur les puces BioArray a permis d'identifier :

- 34 échantillons porteurs d'un allèle *RHCE*ceMo* dont deux homozygotes de phénotype prédit RH :-61, les 32 autres avec un allèle *RHCE*cE* en *trans*
- Deux patients porteurs d'un allèle *RHCE*ceS(340)* avec un allèle *RHCE*cE* en *trans*
- Un patient homozygote pour l'allèle *RHCE*E*
- Six patients pour lesquels aucun variant du *RHCE*e* n'est détecté et pour lesquels les 10 exons du gène *RHCE* ont été séquencés

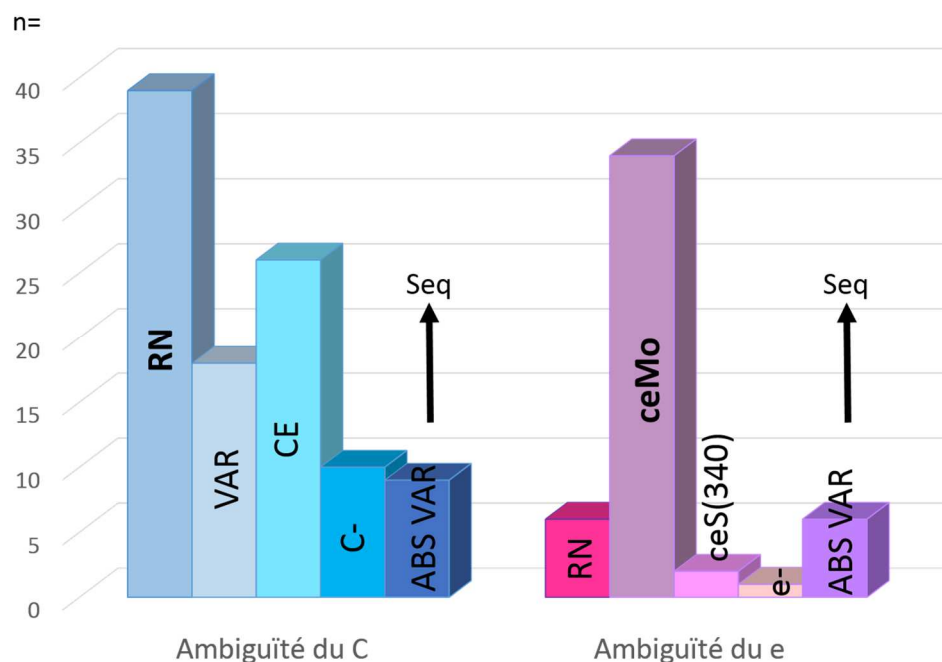


Figure 13. Variants du gène *RHCE* identifiés en technique de 1^{ère} intention pour les ambiguïtés des antigènes RhC et Rhe sur 151 échantillons analysés. VAR : autres variants de l'allèle *RHCE**C, ABSVAR : absence de variant en technique de 1^{ère} intention, la flèche noire indique les échantillons adressés au séquençage.

c. Ambiguïté du phénotype Rhc

Parmi les 18 échantillons présentant une ambiguïté du Rhc (**Figure 14.**), trois étaient porteurs de l'allèle variant *RHCE**ceS(340), quatre étaient homozygote pour l'allèle *RHCE**C. Pour les 11 échantillons restant, l'analyse de première intention n'identifie aucun variant du Rhc, le logiciel conclut à la présence soit d'un allèle *RHCE**cE, soit d'un allèle *RHCE**ce. En raison de l'ambiguïté du phénotype, nous avons approfondi l'étude de ces 11 échantillons en séquençant l'ensemble des séquences codantes du gène *RHCE*.

d. Ambiguïté du phénotype RhE

Trente-deux échantillons présentant une ambiguïté RhE ont été génotypés sur les puces BioArray, 17 étaient porteurs d'un allèle *RHCE**E typeIV, cinq étaient homozygote pour le polymorphisme 676G dans l'exon 5 indiquant l'absence d'allèle *RHCE**E et 10 étaient porteurs d'un allèle *RHCE**E sans que les puces BioArray ne

détecte de variant (**Figure 14.**). Les 10 exons du gène *RHCE* ont été séquencés dans ces 10 échantillons pour identifier l'origine de l'ambiguïté observée au phénotype.

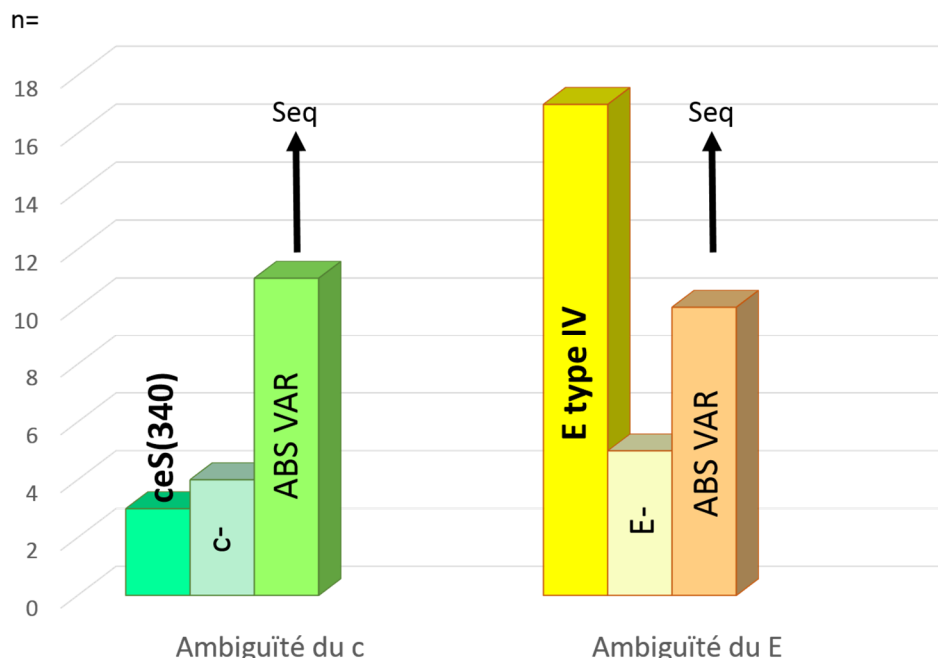


Figure 14. Variants du gène *RHCE* identifiés en technique de 1^{ère} intention pour les ambiguïtés des antigènes Rhc et RhE sur 50 échantillons. ABSVAR : absence de variant en technique de 1^{ère} intention, la flèche noire indique les échantillons adressés au séquençage.

e. Identification caractérisation des nouveaux variants du *RHCE*

Le séquençage des 10 exons du gène *RHCE* a été réalisé sur les 36 échantillons pour lesquels aucun variant n'a été identifié par les tests de génotypage courant. Nous avons ainsi identifié des variants du *RHCE* décrits mais non recherchés par la technique Bioarray. Plusieurs allèles différents ont été retrouvés plusieurs fois, comme par exemple les allèles *RHCE*cE(916G)* ($n=2$), ou *RHCE*cE(1130)* ($n=2$), tous deux associés à un affaiblissement de l'expression de l'antigène RhE, ou l'allèle *RHCE*RHCE(IVS3-5G)* ($n=2$), associé à une réactivité Rhe faible et RhC très faible (les variants retrouvés au séquençage sont listés en Annexe 5). Enfin le séquençage a également permis de décrire six nouveaux variants du gène *RHCE* (**Tableau VII**). Chaque polymorphisme a été assigné sur un des deux allèles *RHCE* en se basant sur les données du phénotype, notamment l'antigène pour lequel une ambiguïté est observée. Les résultats des analyses phénotypiques obtenus en utilisant différentes

techniques (tube salin, gel filtration, ou microplaques) par les laboratoires qui nous ont adressé les échantillons ont été colligés et sont rapporté dans le **Tableau VII**.

Chacun de ces nouveaux variants est caractérisé par un polymorphisme dans un des exons du gène *RHCE*. Trois de ces polymorphismes sont prédits pour coder des changements d'acide aminé dans la protéine. Leur impact sur la stabilité de la protéine a été prédit grâce à deux outils bioinformatiques disponibles en ligne : les interfaces MuStab (<http://bioinfo.ggc.org/mustab/>) et PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) toutes deux présentent l'avantage de donner des prédictions associées à des intervalles de confiance qui permettent une interprétation plus aisée. Les résultats sont reportés dans le **Tableau VII**. Ainsi, les polymorphismes 101A>G (Tyr34Cys), 893G>A (Gly298Asp) et 463A>T (Met155Leu) portés par un allèle *RHCE**ce affectent probablement la stabilité de la protéine RhCE. Les résultats sont moins clairs concernant le polymorphisme 382G>C (Gly128Arg) assigné sur un allèle *RHCE**cE. En effet, alors que MuStab prédit une diminution de la stabilité de la protéine, PolyPhen-2 suggère un effet bénin du remplacement de la glycine par une arginine. Les données d'héماغglutination pour ces différents variants montrent des réactivités d'intensité très variables en fonction des techniques et des anticorps utilisés.

Le polymorphisme 554G>A qui affecte l'antigénicité RhC est un polymorphisme non-sens prédit pour introduire un codon stop prématuré. De fait la protéine RhCe codée par cet allèle contient 185 acides aminés au lieu de 417. Au regard des contraintes conformationnelles de la protéine RhCE exprimant une mosaïque d'épitopes et des contraintes de stabilité à la membrane (interactions avec le cytosquelette et la palmitoylation permettant l'ancrage à la membrane) il est probable que le polypeptide variant n'est pas présent à la membrane. Enfin, un même polymorphisme (939G>A) est retrouvé associé à des ambiguïtés des phénotypes RhCe et Rhe. Il est à noter qu'il s'agit d'un polymorphisme synonyme (Pro313Pro) qui affecte le dernier nucléotide de l'exon 6 et conduit très probablement à un défaut d'épissage de l'intron 6.

Tableau VII. Description des six nouveaux variants du gène *RHCE* et prédiction de l'impact des polymorphismes non-sens sur la stabilité de la protéine RhCE. Le phénotype a été transmis par le laboratoire d'immuno-hématologie qui nous a adressé l'échantillon.

Antigène(s) affecté(s)	Allèle	Phénotype RhCE [#]	SNP	Changement acide aminé	Effet de la substitution		Hémagglutination*		
					Stabilité MuStab [§]	PolyPhen-2 [§]	Gel clone	Microplaque clone	Tube salin clone
C	<i>RH*Ce(554A)</i>	Cv E- c+ e+	554G>A	Trp185Stop	na	na	DP MS24		
C	<i>RH*Ce(939A)</i>	Cv E -c+ e+	939G>A	Pro313Pro	na	na	3+ Mix1	- Mix1	
C et e	<i>RH*Ce(939A)</i>	Cv E+ c+ ev	939G>A	Pro313Pro	na	na	DP Mix1 DP Mix2	1+ Mix1 1+ Mix2	(+) Mix3 - Mix2
e	<i>RH*ce(939A)</i>	C- E+ c+ ev	939G>A	Pro313Pro	na	na	DP Mix2	? Mix2	2+ Mix2
c	<i>RH*ce(101G)</i>	C+ E- cv e+	101A>G	Tyr34Cys	Décrue 87,86%	PD 0,997 (0.41; 0,98)	4+ MS33 - H48		
c	<i>RH*ce(463T)</i>	C+ E- cv e+	463A>T	Met155Leu	Décrue 81,61%	PD 0,582 (0.88; 0,91)	4+ MS42 1+ H48		
c	<i>RH*ce(893A)</i>	C+ E- cv e+	893G>A	Gly298Asp	Décrue 83,57%	PD 1.000 (0.00; 1.00)	DP MS42		
E	<i>RH*cE(382C)</i>	C- Ev c+ e+	382G>C	Gly128Arg	Décrue 80,89%	B 0.367 (0.90; 0.89)	DP 906	? 906	3+ Mix4

[#] v=variant.

[§] Prédiction du logiciel et intervalle de confiance. [§]Prédiction (PD: *Probably Damaging*; B: *Benign*) et probabilités associées : Score (spécificité ; sensibilité).* DP : double population ; ? : non interprétable ; Mix 1 : P3X25513G8+MS24; Mix2 : MS16+MS21+MS63, Mix3 :MS24+MS273, Mix4 : MS258+MS80

2. Etude moléculaire des patients présentant une ambiguïté phénotypique au sein du système KEL.

Classiquement les prélèvements adressés au laboratoire pour la détermination du génotype *KEL *01/*02/*03/*04* sont des échantillons de patients pour lesquels le phénotype Kell n'est pas réalisable en raison d'une transfusion récente. La détermination du génotype *via* Bioarray HEA permet de prédire le phénotype Kell pour envisager les transfusions.

Parallèlement, d'autres échantillons nous ont été adressés en raison d'une ambiguïté phénotypique des antigènes KEL1 ou KEL2, non associée à un historique transfusionnel. Pour ces 11 échantillons, le génotypage *KEL *01/*02/*03/*04* a été réalisé comme précédemment, dans un premier temps :

- Trois des échantillons ont été retrouvés *KEL *01/*02 KEL *03/*04* et, comme la présence d'un allèle *KEL *03* est cohérente avec l'affaiblissement antigénique observé, aucune investigation complémentaire n'a été réalisée.

- Les huit autres échantillons présentent un génotype *KEL *04/*04* et, en raison de l'ambiguïté phénotypique observée, les 19 exons de *KEL* ont été séquencés.

Cette cohorte a été enrichie avec cinq autres échantillons de notre ADNothèque présentant les mêmes caractéristiques dans le cadre d'une étude rétrospective. Ainsi, le résultat du séquençage des 13 échantillons confirme les génotypes observés en technique de première intention. Tous les échantillons sont homozygotes pour les allèles *KEL *04* et *KEL *07*, trois sont *KEL *02/KEL *02* et 10 *KEL *01/KEL *02*.

Deux des échantillons *KEL *02/KEL *02* ne présentent aucun autre polymorphisme, alors que le troisième a un polymorphisme faux-sens non décrit (575G>C) à l'état hétérozygote dans l'exon 6 (échantillon 5, **Tableau VIII.**).

Sur les 10 échantillons hétérozygotes *KEL *01/KEL *02*, quatre ne présentaient aucun autre polymorphisme lors du séquençage. Un échantillon possédait le polymorphisme 977C>T hétérozygote dans l'exon 9, associé à l'allèle *KEL *01.M02* déjà décrit. Les cinq échantillons restant étaient porteurs d'au moins un nouveau polymorphisme faux-sens à l'état hétérozygote. Ces polymorphismes ont été attribués à l'allèle *KEL *01* ou *KEL *02* en fonction de l'incohérence du phénotype (**Tableau VIII.**). Quatre des six échantillons avaient également un polymorphisme synonyme :

1680A>C dans l'exon 15 (Pro560Pro, échantillons 1 et 4), 1899A>G dans l'exon 17 (Leu633Leu, échantillon 3) ou 1920G>C dans l'exon 17 (Gly640Gly, échantillon 2)

Tableau VIII. Description des six nouveaux variants du *KEL*.

Echantillon	Allèles	Réactivité observée	Génotype Bioarray	SNP	Exon	Acide aminé
1	<i>KEL</i> *01M.03 <i>KEL</i> *02	KEL1 faible	<i>KEL</i> *01/*02	578C>T	Exon 6	Thr193Met
				1339C>T	Exon 12	Arg447Trp
				1680A>C	Exon 15	Pro560Pro
2	<i>KEL</i> *01M.04 <i>KEL</i> *02	KEL1 faible	<i>KEL</i> *01/*02	578C>T	Exon 6	Thr193Met
				1920G>C	Exon 17	Gly640Gly
				1921G>A	Exon 17	Gly641Arg
3	<i>KEL</i> *01M.05 <i>KEL</i> *02	KEL1 faible	<i>KEL</i> *01/*02	578C>T	Exon 6	Thr193Met
				1899A>G	Exon 17	Leu633Leu
				1934C>T	Exon 17	Ala645Val
4	<i>KEL</i> *01M.06 <i>KEL</i> *02	KEL1 faible	<i>KEL</i> *01/*02	578C>T	Exon 6	Thr193Met
				1680A>C	Exon 15	Pro560Pro
				2107G>C	Exon 19	Gly703Arg
5	<i>KEL</i> *02M.15 <i>KEL</i> *02	KEL1 faible	<i>KEL</i> *02/*02	575G>C	Exon 6	Arg192Pro
				578C/C	Exon 6	Thr193Met
6	<i>KEL</i> *02M.16 <i>KEL</i> *01	KEL2 faible	<i>KEL</i> *01/*02	578G>T	Exon 6	Thr193Met
				788G/A	Exon 8	Gly263Glu

En collaboration avec le Dr Isabelle Callebaut (Département de biologie structurale, IMPMC, CNRS), une modélisation 3D du domaine endopeptidase de Kell a été réalisée sur le moule de l'enzyme de conversion de l'endothéline ECE-1 (*endothelin-converting enzymes*, famille des métalloprotéase à zinc comme Kell) en complexe avec un inhibiteur (le phosphoramidon) (**Figure 15.**). D'après ce modèle, le domaine extracellulaire de Kell est composé de deux lobes (domaines 1 et 2) reliés entre eux par des segments peptidiques. La cavité peptidique se trouve à l'interface des deux lobes. Les structures des protéines codées par les allèles *KEL**01 et *KEL**02 sont similaires.

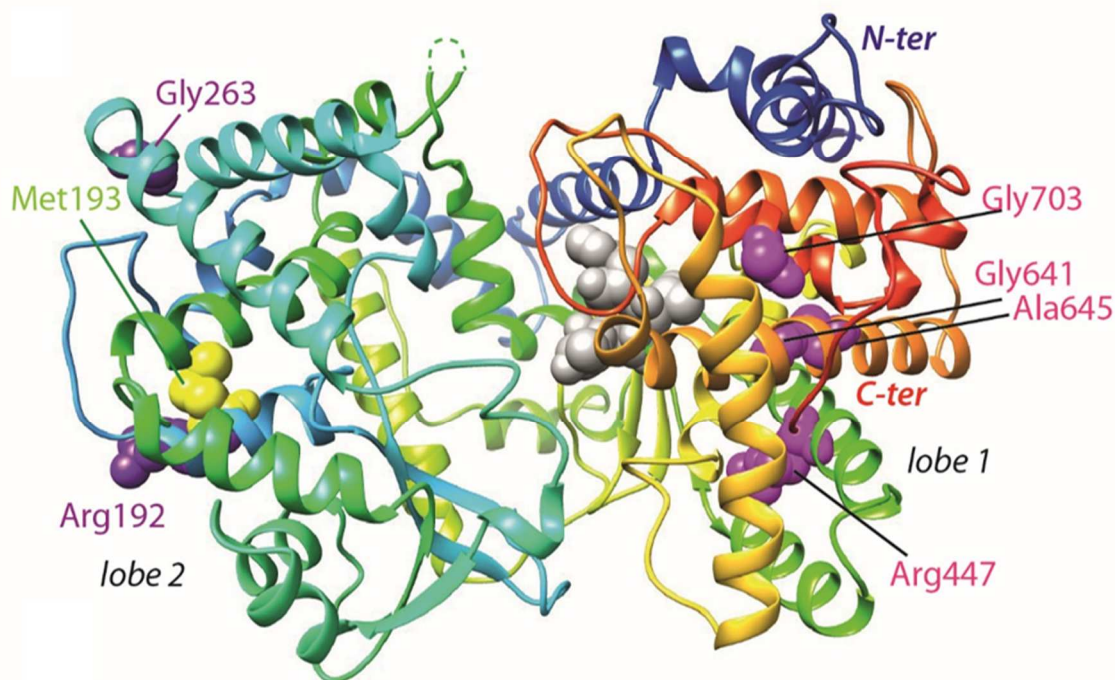


Figure 15. Vue globale de la Modélisation de la structure 3D du domaine extracellulaire de la protéine Kell. Cette figure, montre la cavité centrale où se trouve le site catalytique (le phosphoramidon est représenté en gris). Les acides aminés dont les substitutions sont associées aux nouveaux allèles variants *KEL* sont positionnés sur le modèle. Les acides aminés représentés en rose (Arg447, Gly641, Ala645, Gly703) sont enfouis au sein des hélices, alors que ceux représentés en violet (Arg192 et Gly263) sont exposés au solvant. La position de l'acide aminé Met193 associé à l'allèle *KEL*01* est représentée en vert. Le lobe catalytique (Lobe 1) et le deuxième lobe (plus petit) sont indiqués.

Ce modèle 3D permet de localiser les substitutions Arg447Trp, Gly641Arg, Ala645Val et Gly703Arg enfouies au sein des hélices du domaine catalytique alors que les substitutions Arg192Pro et Gly263Glu sont localisées dans le domaine 2. L'arginine 447 est exposée au niveau de l'hélice C1 (**Figure 16.**), les deux résidus azote de sa chaîne latérale pouvant établir des liaisons hydrogène avec les groupes CO des leucine 475 et alanine 473. La glycine 703 quant à elle est enfouie au sein de l'hélice M1, une région de fort encombrement stérique n'autorisant pas beaucoup de substitution sans gêne stérique résultant de l'interpénétration des rayons de van der Waals de deux atomes (ou clash stérique). L'alanine 645 est localisée dans un endroit très contraint par le packing très compact entre hélices F1 et J1. Elle fait face à un acide aminé sans chaîne latérale (glycine 576), comme cela est également le cas pour le couple alanine 576/glycine 641. Ces régions de F1 et de J1 qui se font face ont des

caractéristiques de séquence bien particulière (J1 (645) VGGLAIALQA ; F1 (G576) GAAGSIMAA), témoins de cette organisation structurale. La glycine 263 située dans la boucle entre H2 et G2 est exposée au solvant. L'arginine 192 est située en N-terminal de E2 et est, elle aussi, exposée au solvant. L'ensemble de ces modifications affecte le repliement de la protéine ou sa stabilité.

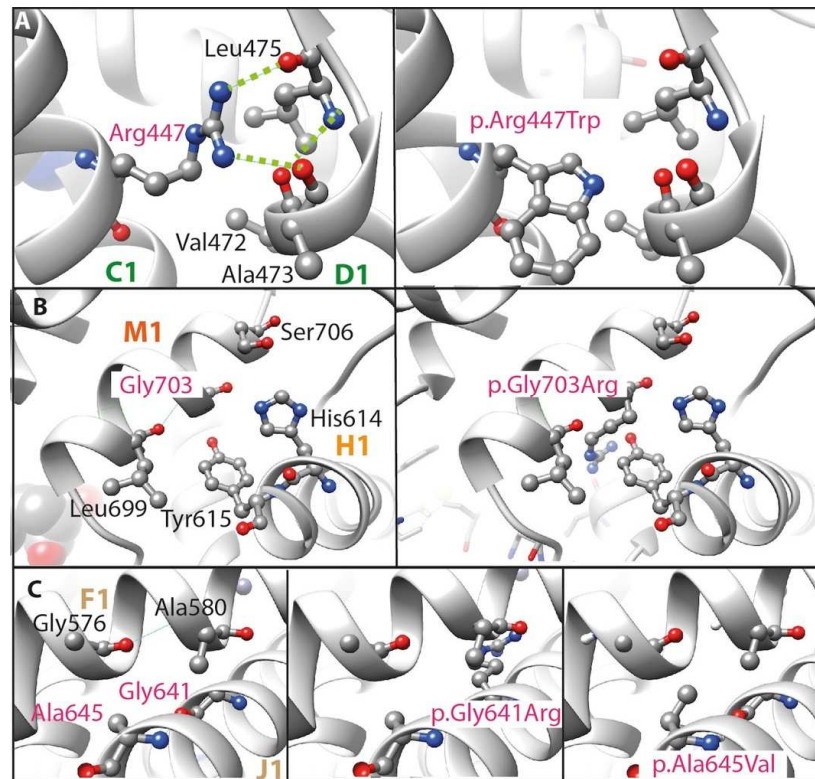


Figure 16. Effet des substitutions des chaînes latérales des variants *KEL*.

A gauche: Position des quatre acides aminés enfouis (Arg447 (A), Gly703 (B), Gly641 et Ala645 (C)), dont les substitutions sont associées à des nouveaux allèles variant *KEL*. Vue de droite: les mêmes positions avec des chaînes latérales substituées par celles trouvées dans les nouveaux allèles variant *KEL*. Ces dernières structures 3D mettent en évidence la perte de liens (A) et, les encombrements stériques et les clashes introduits par les chaînes latérales (A à C), ce qui empêcherait le repliement correct du domaine ou, au moins, impacterait sa stabilité.

3. Génotypage Vel

La mise au point de la PCR de la discrimination allélique du système VEL a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps j'ai dessiné les amorces et les sondes en me basant sur les données de la littérature. J'ai ensuite réalisé la mise au point technique en utilisant des échantillons de génotype connu. J'ai donc sélectionné un échantillon Vel négatif identifié par le CNRGS et un échantillon Vel positif (sauvage). Ces ADNs, m'ont permis, par simple dilution, de générer un échantillon Vel hétérozygote. Ces trois ADNs ont été utilisés pour définir les conditions de PCR (température d'hybridation/élongation, concentrations d'amorces et de sondes...). Le résultat de la discrimination allélique pour ces témoins est présenté dans la **Figure 17**. Ces trois ADNs ont ensuite été utilisés comme contrôles inclus dans toutes les déterminations des génotypes Vel.

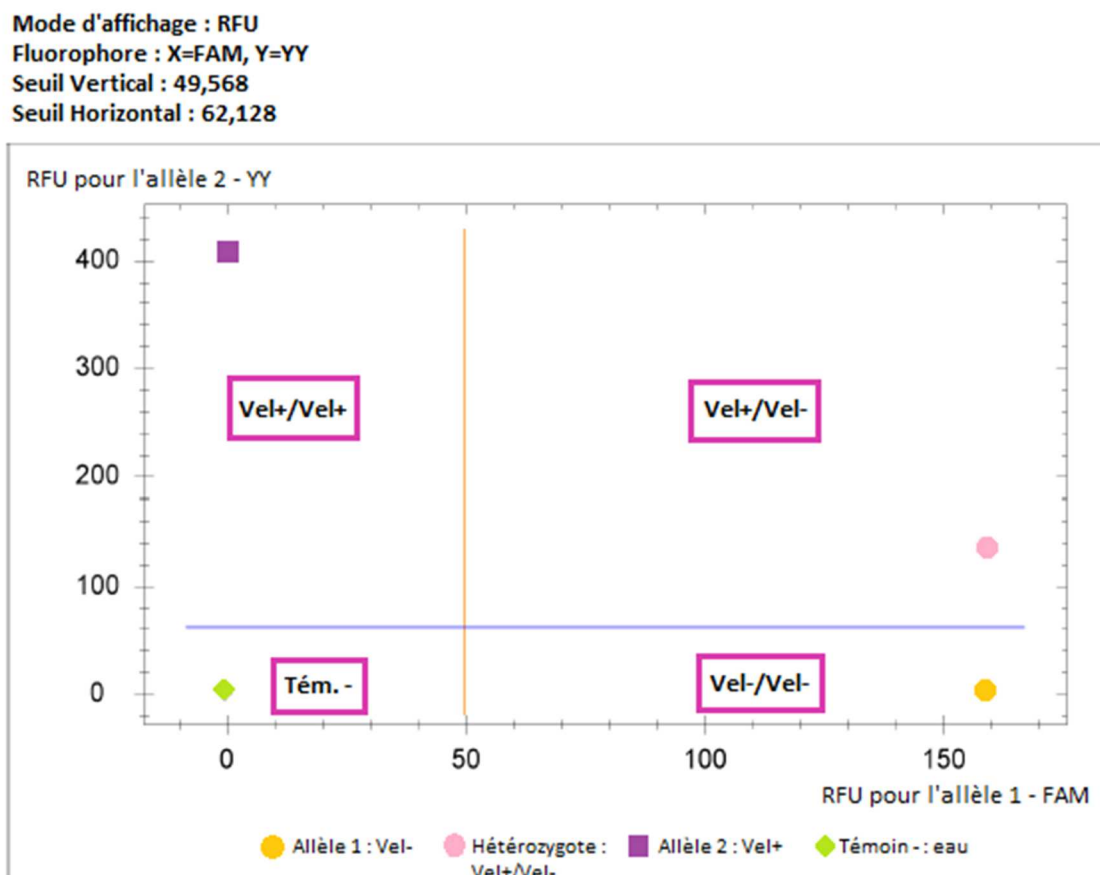


Figure 17. Résultats de l'analyse par discrimination allélique du Vel

Après avoir fixé les conditions expérimentales, une validation a été réalisée en analysant à l'aveugle des ADNs de patients Vel-négatifs identifiés antérieurement par le CNRGS et issus des collections de l'EFS-AM (n=9) et de patients Vel-positifs (n=11). La comparaison des données du génotype et du phénotype a montré une concordance de 100%. Ainsi, nous n'avons observé aucun faux positif, ni faux négatif, ce qui valide notre approche et nous a permis d'utiliser ce test en routine en IHR dans le cadre de l'activité de génotypage érythrocytaire de l'EFS-AM.

La détection de l'allèle codant pour le phénotype Vel-négatif est réalisée en routine dans le laboratoire IHR de l'EFS-AM depuis janvier 2015. Depuis cette date, la recherche du phénotype prédit Vel-négatif a été réalisée sur 46 échantillons de patients en raison d'une allo-immunisation dirigée contre un antigène de haute ou très haute fréquence. Parmi les 46 échantillons testés, 44 sont de phénotype prédit Vel-positif en raison d'une homozygotie pour l'allèle sauvage (n=43), ou d'une hétérozygotie Vel+/- (n=1). Deux patients ont été identifiés homozygotes pour la délétion de 17 pb dans l'exon 3 du gène *SMIM1* avec un phénotype prédit Vel-négatif. Les résultats des patients identifiés hétérozygote Vel+/- et homozygote Vel -/- ont été confirmés par séquençage de l'exon 3 du gène *SMIM1*. Les deux patients identifiés Vel-négatif ont été enregistrés au CNRGS dans la base de données des phénotypes érythrocytaires rares.

4. Détection des allèles *YT*01* et *YT*02* par PCR allèle spécifique

J'ai réalisé la mise au point de deux PCR, l'une spécifique de l'allèle *YT*01* et l'autre de *YT*02*. Dans un premier temps j'ai identifié les amorces en me basant sur les données de la littérature. J'ai ensuite réalisé la mise au point technique en utilisant trois échantillons de génotype connu *YT*1/*1*, *YT*1/*2* et *YT*2/*2* issus de notre collection. Ces ADN m'ont permis de définir les conditions de PCR (voir matériels et méthodes). J'ai ensuite utilisé ces ADN comme contrôles dans toutes mes détections des allèles *YT*01* et *YT*02*.

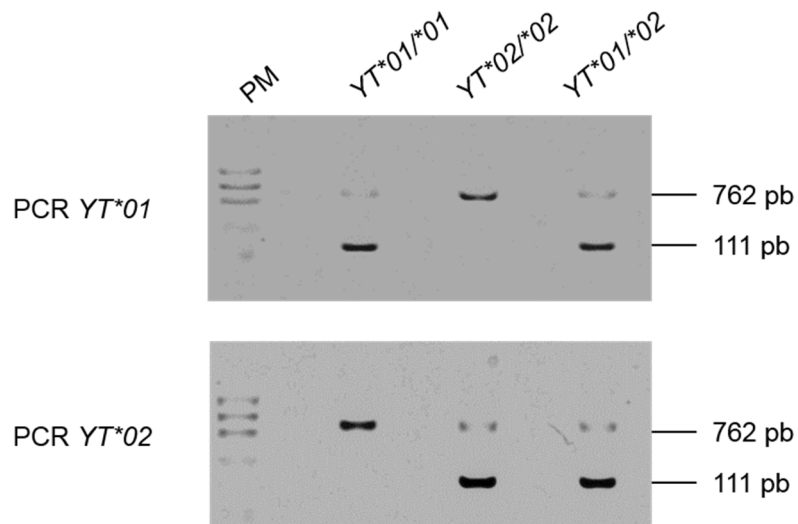


Figure 18. Migration sur gel d'agarose des PCR allèles spécifique *YT*01* et *YT*02* (111 pb). Le contrôle interne à 762 pb correspond à l'exon 4 du gène *RHCE*. PM : Marqueur moléculaire : Φ X174.

Une fois les conditions expérimentales mises au point, j'ai analysé des ADNs de patients déjà génotypés *YT*1/*1* (n=2), *YT*1/*2* (n=3) et *YT*2/*2* (n=5) issus de notre DNAtèque. La comparaison de nos résultats et des données du génotype connu a montré une concordance de 100%. La validation de ce test doit être poursuivie en testant à l'aveugle un plus grand nombre d'échantillons déjà connus afin de vérifier sur une cohorte plus large l'absence de faux positifs et/ou faux négatifs. L'utilisation en routine par le laboratoire IHR de génotypage érythrocytaire pourra alors être envisagée.

V. DISCUSSION

1. Ambigüité phénotypique du RHD

A. Bioarray RHD

Nous avons analysé 461 échantillons présentant une ambigüité lors du test d'hémagglutination. Nos résultats montrent que 63,3% d'entre eux sont de phénotype D faible type 1, D faible type 2 ou D faible type 3. Ce pourcentage est légèrement inférieur à ce qui est décrit en Europe puisque de nombreuses études rapportent une fréquence variant de 79 à 95% [25, 27-29]. Une hypothèse pouvant expliquer cela est la grande proportion de patients d'origine afro-antillaise (drépanocytaires) dans notre cohorte. Les patients porteurs de ces phénotypes ne sont pas considérés à risque d'allo-immunisation [22] bien que quelques immunisations aient été rapportées [59]. Ils sont donc considérés RhD-positif et transfusés avec des CGRs (Concentrés de Globules Rouges) exprimant l'antigène RhD. Dans le cas de grossesse, la prophylaxie anti-D, qui consiste à injecter aux patientes RhD-négatives non immunisées, des immunoglobulines anti-D passives dans les situations à risque, n'est pas nécessaire. Les patients porteurs d'autres variants, qu'ils soient identifiés par le test de première intention (comme les allèles *RHD**DAR, *RHD**DAU2, *RHD**D faible type 4.0 ou 4.3...) ou non, sont tous considérés à risque d'allo-immunisation. Dans un contexte transfusionnel, ils recevront des CGRs de phénotype RhD-négatifs et dans un contexte obstétrical, la prophylaxie anti-D est nécessaire.

Ainsi dans le cas d'une ambigüité du phénotype, le génotypage *RHD* permet une meilleure gestion des ressources. En effet, comme nous venons de le voir les CGRs RhD-négatifs, les plus rares (15% de la population française), sont conservés pour les patients qui ont un risque élevé d'allo-immunisation, puisque les patients identifiés D faible type 1, D faible type 2 ou D faible type 3 sont transfusés sans risque avec des CGRs RhD-positif. Dans le cadre du suivi obstétrical, le génotypage RhD permet d'éviter des injections de produits d'origine humaine (les immunoglobulines anti-D passives utilisées lors de la prophylaxie ciblée et visant à prévenir les immunisations anti-D pouvant entraîner des hémorragies fœto-maternelles) à des patientes qui ne présentent pas de risque d'immunisation.

B. Nouveaux variants RHD

Les patients présentant une ambiguïté du phénotype RhD et pour lesquels le test BioArray n'identifie aucun variant, ont été analysés par séquençage. Ces 30 patients, sont considérés à risque d'immunisation et si une transfusion est nécessaire, ils recevront des CGRs RhD-négatif. Parmi eux, 10 étaient porteurs d'un allèle non décrit. Tous les polymorphismes faux-sens mis en évidence affectent des acides aminés localisés soit dans des domaines transmembranaires de la protéine RhD, soit dans les boucles intra-cellulaires [58]. Une telle localisation est généralement associée aux phénotypes Rh faibles dans lesquels l'ensemble des épitopes sont exprimés mais présentent une expression affaiblie [60]. En accord avec ces observations, nous avons estimé le nombre de sites antigéniques codés par ces différents allèles au moyen de quatre anticorps monoclonaux ciblant les épitopes 2.1, 3.1, 5.4 et 6.3. Comme attendu, le nombre de sites moyen est inférieur à 10.000 sites RhD/GR (le nombre de sites pour un RhD sauvage varie en fonction de l'haplotype *RH*, d'environ 10.000 pour un haplotype RhD-RhCe/Ce, jusqu'à 35.000 pour un RhD-RhCe/cE) [21].

Néanmoins certaines de nos observations de cytométrie ne sont pas totalement en accord avec l'outil de prédiction de la stabilité de la protéine Polyphen-2. En effet, les échantillons porteurs des polymorphismes pour lesquels Polyphen-2 prédit une absence d'effet sur la stabilité de la protéine (*RHD(I25F)*, *RHD(D35E,A399T)* et *RHD(E398V)*) ont une densité antigénique variant de 648 à 8804 sites/GR. Cette discordance apparente entre les données de prédiction et les mesures biologiques peut avoir plusieurs raisons. Tout d'abord nous n'avons utilisé qu'un seul logiciel de prédiction et il a été rapporté que les prédictions peuvent varier suivant le logiciel utilisé [61]. De plus, dans la mesure où Polyphen-2 est basé sur un alignement de séquence, il ne prend pas en compte la structure 3D de la protéine, or les protéines Rh sont fortement repliées et leur interaction avec les protéines du complexe RH sont indispensables à leur maintien à la membrane. D'ailleurs, les polymorphismes désignés « bénins » par l'analyse *in silico* affectent des acides aminés localisés dans les domaines transmembranaires M0 et M1 ou le domaine intracellulaire ICL7. Les domaines M0 et M1 sont impliqués dans la stabilité des molécules Rh au niveau membranaire *via* un rôle dans les interactions entre les sous-unités du RH [62]. On peut donc suggérer que ce sont les interactions entre les molécules Rh au sein du complexe qui sont affectées en présence d'une phénylalanine en position 25 ou d'un

acide glutamique en position 35. Par ailleurs, le domaine ICL7 est impliqué dans les interactions entre les molécules Rh et l'ankyrine et des changements d'acides aminés dans cette région sont associés à une faible expression de l'antigène RhD [63].

Un des nouveaux variants présente la transversion 761C>G qui introduit un codon stop prématuré en accord avec le phénotype RhD-négatif observé pour cet échantillon. Ce polymorphisme pourrait conduire à la dégradation des ARNm non-sens (NMD, *Nonsense-Mediated Decay*), un mécanisme de contrôle qualité des ARNm qui vise à dégrader sélectivement les ARNm portant un codon Stop prématuré pour éviter l'accumulation de protéines Rh tronquées dans les cellules [64, 65].

Enfin, un polymorphisme intronique a été mis en évidence dans un échantillon exprimant 11.910 sites/GR. Ce polymorphisme, qui affecte le troisième nucléotide de l'intron 2, pourrait affecter l'épissage du transcrit. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée pour des raisons techniques. En effet, dans le sang circulant, les seules cellules de la lignée érythroïde contenant de l'ARN sont les réticulocytes. Les échantillons de sang total dont nous disposons ne sont pas compatibles avec l'analyse des transcrits *RH*. Pour réaliser ce type d'approche il faudrait disposer d'un grand volume de sang frais sachant que les réticulocytes ne représentent que 0.5 à 2% des cellules sanguines. La disponibilité de tels échantillons est toujours complexe à obtenir. Des tests de minigènes peuvent également être envisagés pour démontrer un rôle dans l'épissage du transcrit comme cela a été réalisé pour le variant *D faible type 2* [66].

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Transfusion* permettant d'enrichir la base de données des variants du *RHD* [67] .

2. Ambiguïté phénotypique des antigènes RhC, Rhe, Rhc et RhE.

A. *RHCE*CeRN* et BioArray *RHCE*

Nous avons analysé 201 échantillons présentant une ambiguïté pour au moins l'un des antigènes RhC, Rhe, Rhc et RhE lors du test d'héماغglutination. La majorité des ambiguïtés concerne les antigènes RhC et Rhe (75.1%). Les ambiguïtés RhC ou RhC et Rhe sont expliquées dans plus d'un tiers des cas (38%) par la présence d'un allèle *RHCE*CeRN*, et 69% des ambiguïtés Rhe par la présence d'un allèle *RHCE*ceMO*. Ces deux allèles sont décrits dans les populations d'ascendance africaine [68, 69],

connues pour avoir une fréquence élevée de variants *RHCE*. Ces observations soulignent la mixité de la population suivie par l'EFS-AM, qui comprend de nombreux individus d'origine africaine, parmi lesquels on retrouve des patients drépanocytaires. Les allèles *RHCE*CeRN* et *RHCE*ceMO* sont associés à l'expression d'antigènes partiels et, à l'état homozygote, ils sont à la base des phénotypes rare RH :-46 (patients *RHCE*CeRN/*CeRN*) et RH :-61 (patients *RHCE*ceMO/*ceMO*) [70, 71]. Parmi les 201 échantillons investigués trois étaient de phénotype RH :-46 et deux de phénotype RH :-61. Ces patients nécessitent l'utilisation d'unités de sang rares en cas de transfusion et ont été enregistrés au CNRGS pour prévoir un programme de congélation de leurs CGRs.

Les ambiguïtés Rhc sont beaucoup moins fréquentes (9% des échantillons) ceci est probablement lié (i) à la fréquence plus faible des variants de l'allèle *RHCE*c* [68, 69] et (ii) à la fréquence élevée des génotypes *RHCE*c* homozygote.

Enfin, la moitié des ambiguïtés RhE (16% des ambiguïtés) sont associées à la présence d'un allèle *RHCE*cE type IV*, allèle décrit dans les populations d'Europe de l'Ouest et codant l'expression d'un antigène RhE faible.

Comme le génotypage *RHD*, le génotypage *RHCE* permet d'identifier les patients à risque d'allo-immunisation, et d'adapter la consigne transfusionnelle. Il nous a également permis de détecter des patients exprimant un phénotype rare. Ainsi la réalisation de ce génotypage permet de donner le bon produit au bon patient.

B. Nouveaux variants *RHCE*

Le séquençage des 10 exons du gène *RHCE* a permis d'identifier six nouveaux variants. L'analyse moléculaire a été complétée par des tests d'hémagglutination en utilisant, lorsque la quantité et la qualité de l'échantillon le permettaient, plusieurs anticorps monoclonaux et plusieurs techniques (gel test, microplaques sur automates et tubes salins). Parallèlement, pour prédire l'effet des changements d'acides aminés codés par les nouveaux polymorphismes identifiés, nous avons réalisé une étude *in silico* grâce aux serveurs web MuStab et Polyphen-2.

Les polymorphismes ont été assignés sur les différents allèles en se basant sur les résultats du phénotype et du génotype *RHCE*. Ainsi, le polymorphisme 893G>A est assigné sur un allèle *RHCE*ce* en raison d'une ambiguïté Rhc dans un échantillon exprimant les antigènes Rhc, RhC et Rhe en absence d'allèle *RHCE*E*. Ce

polymorphisme se traduit par le remplacement de la glycine en position 298 par un acide aspartique. La glycine 298 pourrait jouer un rôle important dans la structure ou la fonction de la protéine. En effet, cet acide aminé est très conservé au sein de la famille RH puisqu'on le retrouve dans la séquence codant les protéines humaines RhBG, RhCG, RhD, RhCE ainsi que dans la séquence du transporteur d'ammonium Amt d'*E. Coli*. L'analyse avec les outils bio-informatiques MuStab et Polyphen-2 sont d'ailleurs en accord avec l'hypothèse que le remplacement de la glycine 298 affecte la stabilité de la protéine. Les données d'héماغglutination révèlent quant à elles un fort affaiblissement de la réactivité avec le clone MS42 qui reconnaît l'antigène Rhc. De façon similaire le polymorphisme 101A>G également porté par un allèle *RHCE**ce se traduit par le remplacement d'un acide aminé très conservé, la tyrosine 34 par une cystéine. Les résultats de prédiction de MuStab et Polyphen-2 sont en accord avec cette observation et avec les données de gel test qui montrent une grande variation dans la réactivité de l'échantillon sanguin avec les différents clones anti-Rhc testés. Un dernier polymorphisme associé à un allèle *RHCE**ce a été décrit dans ce travail, il s'agit de la transversion 463A>T qui affecte l'acide aminé en position 155. Bien que partagé uniquement par les protéines RhD et RhCE, le remplacement de la méthionine 155 par une leucine affecte l'antigénicité Rhc (1+ avec l'anticorps H8 en gel test). Ces observations sont une fois de plus en accord avec les prédictions de MuStab et Polyphen-2, bien que la prédiction de Polyphen-2 soit en faveur d'un effet délétère modéré sur la stabilité de la protéine (la probabilité que la substitution soit délétère, appelée score, est de 0.582, alors que cette probabilité atteint 0.997 et 1.0 pour les substitution en position 101 et 893 respectivement).

La transversion 382G>C sur un allèle *RHCE**cE code le remplacement de la Glycine 128 par une Arginine. La réactivité anti-RhE de cet échantillon est fortement affectée alors que Polyphen-2 prédit une absence d'effet du changement d'acide aminé. MuStab quant à lui prédit une stabilité décruce ce qui semble cohérent non seulement avec les données du phénotype, mais également avec le fait que la glycine 128 est conservée chez l'homme dans les protéines RhBG, RhCG, RhD, RhCE ainsi que dans l'Amt d'*E. Coli*. De plus, l'analyse d'échantillons issus de donneurs de sang originaires d'Asie du sud-est et porteurs d'un allèle *RHCE**CE382A codant pour le remplacement de la glycine 128 par une sérine, montre une héماغglutination d'intensité variable suivant le clone utilisé [72].

Le polymorphisme 554G>A, conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré en position 185. Comme décrit précédemment pour le variant de l'antigène RhD codé par l'allèle *RHD***RHD*(S254X), ce polymorphisme situé dans l'exon 4 du gène *RHCE* pourrait conduire à la dégradation des ARNm non-sens (NMD, *Nonsense-mediated decay*). De façon tout à fait surprenante, le résultat d'hémagglutination indique une réactivité faible (DP, double population) avec le clone MS24 qui reconnaît l'antigène RhC. Malheureusement, l'échantillon sanguin qui nous a été adressé ne nous a pas permis de confirmer ce résultat et de compléter les données immunologiques.

Un dernier polymorphisme a été identifié dans trois prélèvements. Il est porté par un allèle *RHCE**Ce puisqu'il est associé à une ambiguïté de la détection des antigènes RhC et Rhe. Il s'agit de la substitution synonyme C>A, située en position 939 qui affecte le dernier nucléotide de l'exon 6 (**Tableau IX**). Ainsi il semble probable que le remplacement de la guanine 939 par une adénine altère le site donneur d'épissage 5'. Cette hypothèse est confirmée par les données bibliographiques. En effet, la transition 939G>A a été décrite à l'état hétérozygote sur un allèle *RHCE**cE chez un donneur de sang. Pour étudier l'impact de ce polymorphisme sur l'épissage, les auteurs ont purifié les cellules CD34+ du sang du donneur et les ont cultivées *in vitro* en induisant une différenciation érythroïde EPO-dépendante. Ils ont ensuite amplifié par PCR et séquencé les cDNA *RHCE* et ont détecté, en plus du transcrit sauvage, des transcrits présentant un saut partiel ou total de l'exon 6 [73].

3. Ambiguïté phénotypique du système KEL.

Les allo-anticorps du système Kell ont une importance clinique considérable puisqu'ils peuvent être responsables des réactions hémolytiques sévères lors d'une transfusion, ou de MHFNN. L'antigène KEL1 est particulièrement immunogène il est donc essentiel d'identifier de manière fiable les antigènes KEL1 et KEL2 aussi bien chez les donneurs que chez les receveurs afin d'éviter les allo-immunisations anti-KEL1. Ceci peut être compliqué dans le cas d'individus exprimant un/des antigène(s) affaibli(s). Le plus fréquemment, l'affaiblissement est observé en présence d'un antigène KEL3 ou d'un allèle *K_{mod}* [35, 74] .

La modélisation 3D a apporté des données au niveau structurel qui nous ont permis de mieux comprendre l'affaiblissement d'expression de KEL1. Dans notre

modèle le remplacement de l'arginine en position 447 par un tryptophane dans l'échantillon 1 affecte de façon très importante la structure 3D (**Figure 19.**). En effet, l'arginine établit des ponts hydrogène avec les atomes d'oxygène de la leucine 475 et de l'alanine 473 (**Figure 20. A**), ce qui n'est pas le cas du tryptophane. De plus, le tryptophane possède une chaîne latérale volumineuse qui induit des changements stériques importants dans l'hélice D1.

Le remplacement de la glycine 641 par une arginine dans l'échantillon 2 et le remplacement de l'alanine 645 par une valine dans l'échantillon 3 affectent le repliement compact entre les hélices F1 et J1, ce qui affecte la structure de la protéine et la rend moins stable.

Dans l'échantillon 4, un petit acide aminé non chargé (la glycine en position 703) est remplacé par un acide aminé plus volumineux et chargé positivement (arginine). Cette substitution conduit à un conflit stérique (clash stérique), et a un effet sur la stabilité de la protéine. D'ailleurs, le remplacement de la glycine 703 par une arginine a été précédemment décrit associé à l'expression de l'allèle *KEL*02M.04* et les auteurs ont montré que cette substitution affecte le transport de la protéine à la membrane [40].

Bien que l'arginine 192 et la glycine 263 soient toutes deux exposées au solvant leurs substitutions affectent également la structure de Kell. L'introduction d'une proline en position 192 dans l'échantillon 5 pourrait affecter le réseau des ponts hydrogène. Cet échantillon, qui porte le nouvel allèle *KEL*02M.15* présente une ambiguïté du phénotype KEL1. Or, nos analyses moléculaires démontrent une homozygotie pour l'allèle *KEL*02* (c.578C). Ceci est en accord avec l'hypothèse que les anti-KEL1 lient un épitope conformationnel. En raison de la présence d'un allèle *KEL*02* en *trans* nous n'avons pas pu évaluer le potentiel impact de la substitution Arg192Pro sur l'antigénicité KEL2. Dans l'échantillon 6 le remplacement de la glycine 263, qui est très conservée dans la famille des métalloprotéases M13, par un acide glutamique pourrait s'avérer très délétère. En effet, en accord avec nos observations, son remplacement par une arginine est associé à une réduction drastique de l'antigénicité KEL2 [75].

Cette étude rétrospective des ambiguïtés du phénotype des antigènes KEL1 et KEL2 a permis la description de six nouveaux allèles *K_{mod}* [76]. Quatre de ces variants sont portés par un allèle *KEL*01* alors que seuls deux allèles *KEL*01M* étaient décrits jusqu'alors [77, 78] ; les deux autres nouveaux variants sont portés par un allèle *KEL*02*. La fréquence des allèles *K_{mod}* dans la population générale n'est pas connue, une étude réalisée au Pays-Bas rapporte qu'environ 3% des donneurs de phénotype

KEL :1-2 sont porteurs d'un allèle *KEL*02M* [79] et nos résultats suggèrent une incidence non négligeable des allèles *KEL*01M*. Aucune donnée n'est disponible concernant d'une part l'immunisation anti-KEL2 chez les patients de phénotype K_{mod} et d'autre part la capacité des phénotypes K_{mod} à induire une allo immunisation chez un receveur. Malgré, cette absence de données de fréquence et d'allo-immunisations liées aux phénotypes K_{mod} , et en se basant sur la dangerosité des allo-immunisations anti-KEL, les résultats sérologiques d'individus KEL2-négatifs devraient être confirmés au moyen d'une analyse de génotypage pour éviter la transfusion de CGRs de phénotype K_{mod} à des patients KEL: 1, -2. Les techniques sérologiques de routine visant à phénotyper l'antigène KEL1 devraient également inclure des antisérums plus sensibles à la détection des phénotypes K_{mod} . De plus, toute ambiguïté de l'antigène KEL1 ou de l'antigène KEL2 lors du typage des donneurs devrait être explorée par génotypage car des divergences entre ces méthodes peuvent être la conséquence de la présence de phénotypes K_{mod} ou K_{nul} .

4. Génotypage des systèmes Vel et YT

Les patients de phénotype rare, sont susceptibles à la suite d'une transfusion, de développer des allo-anticorps dirigés contre les antigènes qu'ils n'expriment pas. Dans les laboratoires IHR, lors de la réalisation des tests de RAI (Recherche d'Agglutinines Irrégulières) la présence de ces anticorps conduit à une panagglutination. Celle-ci peut être due à des anticorps responsables de réactions transfusionnelles graves, dans le cas d'un anti-Vel par exemple, ou peut ne pas présenter de risques pour le patient, comme dans le cas d'un anti-Yta qui n'est responsable que de rares réactions transfusionnelles retardées [21]. Cependant, la présence d'une panagglutination ne permet pas de détecter une éventuelle agglutination due à la présence d'un anticorps qui, lui, pourrait induire une réaction transfusionnelle grave (par exemple un anti-Jka). Connaître la spécificité de l'anticorps responsable de la panagglutination est donc important pour les laboratoires IHR. En effet, dans le cas d'un anticorps présentant un risque de réaction transfusionnelle (anti-Vel), l'identification de l'anticorps permet de sélectionner des produits compatibles, en ayant recours à la banque nationale de sang rare si nécessaire. Dans le cas d'un anticorps ne présentant pas de risque comme les anticorps anti-Yt^a, connaître sa spécificité permet au laboratoire d'IHR de pouvoir

envisager une transfusion incompatible sans que cela ne provoque de réaction transfusionnelle grave chez le patient. De plus l'anti-Yt^a est un des anticorps anti-public (anticorps dirigé contre un antigène érythrocytaire présent chez, au moins, 99% de la population générale **Figure 1.**) le plus fréquent, sa détermination est donc très utile. Le laboratoire d'IHR de l'EFS-AM en charge du génotypage érythrocytaire m'a demandé dans le cadre du développement et l'amélioration des techniques, de développer des tests de génotypage pour identifier les patients de phénotype Vel-négatif et les patients Yt^a-négatifs. En effet, aucun anticorps ne permet de réaliser un phénotype et ces spécificités ne sont pas recherchées dans les trousse de génotypage disponibles.

Nous avons choisi les techniques de génotypage en prenant en compte les contraintes du laboratoire IHR de l'EFS-AM en sélectionnant des techniques rapides, pour lesquelles le laboratoire est équipé. Comme le phénotype Vel-négatif est lié à une délétion de 17 pb dans le gène *SMIM1*, nous avons choisi d'utiliser la chimie Taqman® pour détecter cette délétion. Pour ne pas être confrontés à des problèmes de spécificité nous avons positionné les sondes dans la région de la délétion. Pour la détection des allèles *YT*01* et *YT*02* qui ne diffèrent que d'un nucléotide (1057C>A), nous avons choisi une PCR allèle spécifique qui nous a permis d'introduire des mésappariements pour gagner en spécificité. Dans le futur nous envisageons d'améliorer cette PCR en utilisant des amorces fluorescentes (un fluorochrome par allèle). Ceci permettrait de réaliser les deux amplifications dans un même tube et d'identifier le(s) allèle(s) présent(s) après migration sur gel d'agarose grâce à un lecteur de fluorescence adapté.

Ces tests ont été développés suivant la même procédure, et validés à l'aveugle sur des échantillons connus. Le génotypage Vel nous a permis d'identifier deux patients de phénotype prédit Vel-négatif.

Dans l'année 2015, un anticorps monoclonal anti-Vel de type IgG a été caractérisé [80]. Cet anticorps ne présente qu'un intérêt limité pour les laboratoires IHR car la recherche du phénotype Vel-négatif est généralement réalisée pour des patients récemment transfusés. Par contre, il peut présenter un grand intérêt pour la recherche de donneurs de phénotype Vel-négatif comme récemment démontré [81]. Pour éviter les faux négatifs il faut que ce réactif soit suffisamment sensible pour détecter les phénotypes Vel faibles (le plus souvent hétérozygotes pour la délétion c.64_80del17), et les confirmer par immuno-hématologie ou par biologie moléculaire. Durant la

réalisation de ce travail, deux études ont été menées pour rechercher des donneurs de sang de phénotype Vel-négatif. Une première équipe allemande a développé un test moléculaire sensiblement identique à celui présenté ici, qui a permis d'identifier 5 donneurs de phénotype Vel-négatif parmi 10.598 donneurs testés [82]. La seconde équipe française a phénotypé 981.650 dons avec un réactif monoclonal anti-Vel permettant l'identification de 339 phénotype Vel-négatif [81]. La réalisation de telles études est très importante pour enrichir les banques de sangs rares.

VI. CONCLUSION & PERSPECTIVES

La diversité génétique résulte de l'action du temps qui, suite à des erreurs de la machinerie cellulaire, a permis l'apparition de variants alléliques dont certains ont perduré jusqu'à nous. La diversité s'est ensuite accrue de façon exponentielle en raison, d'une part, des migrations humaines *via* l'apparition « d'accélérateurs technologiques » comme les transports, et d'autre part, des modifications des modes de vie et de la mixité raciale. Ainsi, la porosité génétique entre des populations éloignées géographiquement a été accélérée.

De nos jours il n'est pas surprenant, pour un système érythrocytaire donné, d'identifier chez un individu un génotype complexe constitué d'un allèle caractéristique des populations d'Afrique subsaharienne associé à un allèle d'Europe (génotype *FY*02M.01/FY*02N.01* du système Duffy ou *D faible type 1/(C)ces type 1* du système RH par exemple), d'Asie ou de groupes ethniques particuliers. Il en résulte une expression phénotypique complexifiée difficile à caractériser en l'absence de réactifs immunologiques en particulier d'anticorps spécifiques et d'hématies de références. Ces mêmes réactifs font également cruellement défaut pour identifier des donneurs afin de disposer d'unités de sang compatibles.

Aujourd'hui, l'un des enjeux en médecine transfusionnelle est de développer non seulement ces réactifs immunologiques mais également des outils d'analyses par biologie moléculaire permettant l'identification des polymorphismes caractéristiques des variants alléliques. Le diagnostic indirect par analyses moléculaires permet une meilleure prise en charge des patients qui présentent un risque d'allo-immunisation et permet de détecter les individus de phénotype rare. De fait, les outils de biologie moléculaire, en synergie avec les données immunologiques, permettent la description de nouveaux variants et l'interprétation fonctionnelle des variations génétiques (au niveau du phénotype). Parallèlement, il en résulte une meilleure gestion des ressources et l'optimisation de la sécurité transfusionnelle du patient dans une démarche de santé publique.

Ainsi, notre étude génotypique des variants *RHD* et *RHCE* à partir des patients de l'EFS-AM a montré que 60% des patients avec un phénotype RhD faible ne sont pas à risque d'immunisation et peuvent recevoir des produits sanguins RhD positif. A

contrario, près de 40% des patients présentant une ambiguïté du phénotype RhC présentent un risque d'allo-immunisation anti-RhC.

Parallèlement, nos travaux ont permis d'identifier des patients présentant un phénotype rare. Ainsi, l'étude des ambiguïtés des antigènes RhCE, fréquentes chez les patients d'ascendance africaine, a révélé des patients exprimant un phénotype rare Rh : -46, RH : -61. Nous avons également identifié deux patients de phénotype Vel-négatif présentant la délétion de 17 pb dans le gène *SMIM1* à l'état homozygote. Tous ces patients ont été enregistrés au CNRGS dans la base de données des phénotypes érythrocytaires rares.

Ces résultats soutiennent clairement l'intérêt de l'approche par biologie moléculaire pour identifier et caractériser des individus présentant un phénotype rare. Parallèlement, la mise en œuvre de cette approche pour les donneurs de sang doit être sérieusement envisagée pour disposer de CGRs compatibles avec les patients. Une telle approche implique, dans la mesure du possible, de cibler les populations au regard de la rareté des phénotypes. Ainsi, on peut envisager la recherche des phénotypes RH :-46 uniquement chez les donneurs afro-antillais de phénotype RhCe (51.8% des afro-antillais), des phénotypes RH :-34 chez les donneurs RhD négatifs RhCce (0.1% des afro-antillais) et les phénotypes RH :-18 et RH :-61 chez les Rhce (7.1% des afro-antillais).

Cependant, l'approche par la biologie moléculaire peut parfois être devancée par le développement de nouveaux réactifs monoclonaux comme cela a été le cas récemment avec la production d'un anticorps monoclonal anti-VEL1 et la mise en place d'un dépistage de masse du phénotype VEL-négatif. Cette approche a permis de préciser une prévalence du phénotype VEL-négatif à 6,1/10.000 chez les donneurs du nord de la France.

Enfin nos travaux ont permis l'identification de 16 nouveaux allèles du système RH et six nouveaux allèles du système KEL. Si la diversité des allèles *RHD* est largement étudiée, l'exploration des ambiguïtés RhCE est plus récente et plus complexe en raison de la présence systématique d'un allèle en *trans*. Les ambiguïtés KEL sont quant à elles beaucoup plus rares et, de fait, moins bien décrites. Ainsi, nous nous sommes attachés, pour l'ensemble des ambiguïtés de phénotype rencontrées, à poursuivre nos investigations jusqu'à l'identification d'un allèle pouvant expliquer l'ambiguïté. Cette stratégie, déjà éprouvée pour les ambiguïtés RhD, s'avère également efficace pour le RhCE et le système KEL. Elle doit être poursuivie en

associant à la caractérisation moléculaire des nouveaux variants, des analyses permettant une interprétation phénotypique des variations génétiques identifiées *via* par exemple une approche par cytométrie en flux pour les variants RhCE et KEL. En effet, seule l'association des données du phénotype aux données du génotype voire aux fréquences permettra de déterminer la relevance clinique des allèles identifiés.

De telles études ainsi que le développement de réactifs et d'outils de biologie moléculaire doivent donc être poursuivies pour optimiser les stratégies transfusionnelles des patients et/ou donneurs porteurs de ces variants alléliques.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Lux IV, S.E., *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions*. Blood, 2016. **127**(2): p. 187-99.
2. Peyrard, T., et al., *Les phénotypes érythrocytaires rares : un enjeu de santé publique*. Transfusion Clinique et Biologique, 2008. **15**: p. 109-119.
3. Peyrard, T. and P. Rouger, *La sécurité transfusionnelle et obstétricale des sujets présentant un groupe sanguin érythrocytaire rare*. Hématologie, 2010. **16**(2): p. 143-55.
4. Revelli, N., et al., *The Lombardy Rare Donor Programme*. Blood Transfus, 2014. **12 Suppl 1**: p. s249-55.
5. Hustinx, H., *DGTI Register of Rare Donors*. Transfus Med Hemother, 2014. **41**(5): p. 338-41.
6. Levine, P. and R.E. Stetson, *An unusual case of intra-group agglutination*. JAMA, 1939. **113**(2): p. 126-7.
7. Wiener, A.S., E.B. Sonn, and R.B. Belkin, *Heredity of the Rh blood types*. J Exp Med, 1944. **79**(3): p. 235-53.
8. Wiener, A.S., J. Moor-Jankowski, and E.B. Gordon, *Blood groups of apes and monkeys. IV. The Rh-Hr blood types of anthropoid apes*. Am J Hum Genet, 1964. **16**: p. 246-53.
9. Tippet, P., *A speculative model for the Rh blood groups*. Ann Hum Genet, 1986. **50**(Pt 3): p. 241-7.
10. Mouro, I., et al., *Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system*. Nat Genet, 1993. **5**(1): p. 62-5.
11. Liu, Z., et al., *Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1424-33.
12. Marini, A.M., et al., *The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 341-4.
13. Ripoch, P., et al., *Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH₃ into red blood cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17222-7.
14. Endeward, V., et al., *RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane*. FASEB J, 2008. **22**(1): p. 64-73.
15. Colin, Y., et al., *Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis*. Blood, 1991. **78**(10): p. 2747-52.
16. Singleton, B.K., et al., *The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype*. Blood, 2000. **95**(1): p. 12-8.
17. Silvy, M., et al., *Identification of novel polymorphism restricted to the (C)ces type 1 haplotype avoids risk of transfusion deadlock in SCD patients*. Br J Haematol, 2013. **160**(6): p. 863-7.
18. Pham, B.N., et al., *Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons*. Transfusion, 2009. **49**(3): p. 495-504.
19. Shao, C.P., et al., *Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese*. Vox Sang, 2002. **83**(2): p. 156-61.
20. Tippet, P., C. Lomas-Francis, and M. Wallace, *The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens*. Vox Sang, 1996. **70**(3): p. 123-31.
21. Reid, M.E., Lomas-Francis C, Olsson M. L., *The Blood Group Antigen*. 2012. **3**.
22. Flegel, W.A., *How I manage donors and patients with a weak D phenotype*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(6): p. 476-83.
23. Wagner, T., et al., *Anti-D immunization by DEL red blood cells*. Transfusion, 2005. **45**(4): p. 520-6.
24. Scott, M., *Section 1A: Rh serology. Coordinator's report*. Transfus Clin Biol, 2002. **9**(1): p. 23-9.
25. Müller, T.H., et al., *PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations*. Transfusion, 2001. **41**(1): p. 45-52.

26. Touinssi, M., et al., *Molecular analysis of inactive and active RHD alleles in native Congolese cohorts*. Transfusion, 2009. **49**(7): p. 1353-60.
27. Araújo, F., et al., *Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal*. Transfus Med, 2006. **16**(1): p. 63-7.
28. Christiansen, M., et al., *Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark*. Transfusion, 2008. **48**(1): p. 187-93.
29. Dogic, V., et al., *Distribution of weak D types in the Croatian population*. Transfus Med, 2011. **21**(4): p. 278-9.
30. Pham, B.N., et al., *Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies?* Transfusion, 2011. **51**(12): p. 2679-85.
31. Wagner, F.F., et al., *Weak D alleles express distinct phenotypes*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2699-708.
32. Lee, S., et al., *Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein*. Blood, 1995. **85**(5): p. 1364-70.
33. Clapéron, A., et al., *The Kell protein of the common K2 phenotype is a catalytically active metalloprotease, whereas the rare Kell K1 antigen is inactive. Identification of novel substrates for the Kell protein*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21272-83.
34. Hashmi, G., et al., *Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis*. Transfusion, 2007. **47**(4): p. 736-47.
35. Yazdanbakhsh, K., et al., *Identification of a defect in the intracellular trafficking of a Kell blood group variant*. Blood, 1999. **94**(1): p. 310-8.
36. Molano-Bilbao A., C.M., Kress J., *One KEL*841_842A (Kpc) homozygous case in a Caucasian blood donor*. Transfusion, 2013. **53**: p. 163.
37. Bailly, P.e.a., *Incidence des antigènes de basse fréquence RH10, RH20, KEL6, en Martinique : implications transfusionnelles*. Transfusion Clinique et Biologique, 2009. **16**: p. 63.
38. Ba, A., et al., *Genotyping of 28 blood group alleles in blood donors from Mali: Prediction of rare phenotypes*. Transfus Apher Sci, 2016. **54**(2): p. 289-95.
39. Øyen, R., G.R. Halverson, and M.E. Reid, *Review: conditions causing weak expression of Kell system antigens*. Immunohematology, 1997. **13**(3): p. 75-9.
40. Lee, S., et al., *Mutations that diminish expression of Kell surface protein and lead to the Kmod RBC phenotype*. Transfusion, 2003. **43**(8): p. 1121-5.
41. Pham, B.N., et al., *Allo-immunisation érythrocytaire*. Transfusion Clinique et Biologique, 2012. **19**: p. 321-32.
42. Costamagna, L., et al., *A case of hemolytic disease of the newborn due to anti-Kpa*. Immunohematology, 1997. **13**(2): p. 61-2.
43. Telen, M.J., *Glycosyl phosphatidylinositol-linked blood group antigens and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Transfus Clin Biol, 1995. **2**(4): p. 277-90.
44. Telen, M.J., et al., *Evidence that several high-frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins*. Blood, 1990. **75**(7): p. 1404-7.
45. Zelinski, T., et al., *Assignment of the YT blood group locus to chromosome 7q*. Genomics, 1991. **11**(1): p. 165-7.
46. Eaton, B.R., et al., *A new antibody, anti-Yta, characterizing a blood-group antigen of high incidence*. Br J Haematol, 1956. **2**(4): p. 333-41.
47. Giles, C.M. and M.N. Metaxas, *Identification of the predicted blood group antibody anti-Ytb*. Nature, 1964. **202**: p. 1122-3.
48. Daniels, G., *Human Blood groups*. 2013. **3**: p. 354-8.
49. Arnaud, L., et al., *SMIM1 is a type II transmembrane phosphoprotein and displays the Vel blood group antigen at its carboxyl-terminus*. FEBS Lett, 2015. **589**(23): p. 3624-30.
50. Storry, J.R., et al., *Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype*. Nat Genet, 2013. **45**(5): p. 537-41.
51. Ballif, B.A., et al., *Disruption of SMIM1 causes the Vel- blood type*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(5): p. 751-61.

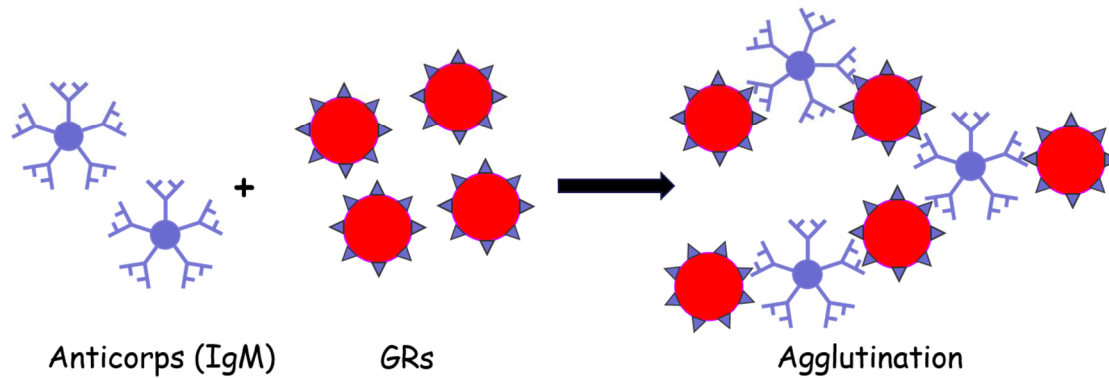
52. Cvejic, A., et al., *SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits*. Nat Genet, 2013. **45**(5): p. 542-545.
53. Gale, S.A., G.P. Rowe, and F.E. Northfield, *Application of a microtitre plate antiglobulin technique to determine the incidence of donors lacking high frequency antigens*. Vox Sang, 1988. **54**(3): p. 172-3.
54. Van der Schoot C., A.S.A., Beckers E., *Genetic Screening for the Vel-phenotype circumvents difficult serological screening due to variable Vel expression levels*. Vox Sang, 2014. **107**(S1): p. 16.
55. Van der Rijst, M., Veldhuisen, B., van der Scoot, E. van den Akker, E., *Identification of two novel mutations in SMIM1 resulting in low vel expression*. Vox Sang, 2017. **112**(S1): p. 53.
56. Christophersen, M.J., Jöud, M., Thuresson, B. et al., *Genetic variants regulate expression of SMIM1 and the Vel blood group antigen*. Vox Sang, 2014. **107**(S1): p. 16.
57. Tournamille, C., et al., *Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization*. Transfusion, 2010. **50**(1): p. 13-9.
58. Silvy, M., et al., *Characterization of novel RHD alleles: relationship between phenotype, genotype, and trimeric architecture*. Transfusion, 2012. **52**(9): p. 2020-9.
59. Flegel, W.A., S.R. Khull, and F.F. Wagner, *Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs*. Transfusion, 2000. **40**(4): p. 428-34.
60. Flegel, W.A., *Molecular genetics and clinical applications for RH*. Transfus Apher Sci, 2011. **44**(1): p. 81-91.
61. Castellana, S. and T. Mazza, *Congruency in the prediction of pathogenic missense mutations: state-of-the-art web-based tools*. Brief Bioinform, 2013. **14**(4): p. 448-59.
62. Callebaut, I., et al., *Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures*. Transfus Clin Biol, 2006. **13**(1-2): p. 70-84.
63. Nicolas, V., et al., *Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25526-33.
64. Lejeune, F. and L.E. Maquat, *Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(3): p. 309-15.
65. Conti, E. and E. Izaurralde, *Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(3): p. 316-25.
66. Fichou, Y., et al., *Extensive functional analyses of RHD splice site variants: Insights into the potential role of splicing in the physiology of Rh*. Transfusion, 2015. **55**(6 Pt 2): p. 1432-43.
67. **Filosa, L., et al., New silent and weak D alleles: molecular characterization and associated antigen density. Transfusion, 2016. 56(8): p. 2154-5.**
68. Granier, T., et al., *A comprehensive survey of both RHD and RHCE allele frequencies in sub-Saharan Africa*. Transfusion, 2013. **53**(11 Suppl 2): p. 3009-17.
69. Kappler-Gratias, S., et al., *Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin*. Blood Transfus, 2014. **12** Suppl 1: p. s264-72.
70. Le Pennec, P.Y., et al., *[The erythrocyte phenotype Rh: 32,-46: transfusional and obstetric importance]*. Rev Fr Transfus Hemobiol, 1989. **32**(4): p. 291-7.
71. Westhoff, C.M., et al., *RHCE*ceMO is frequently in cis to RHD*DAU0 and encodes a hr(S) -, hr(B) -, RH:-61 phenotype in black persons: clinical significance*. Transfusion, 2013. **53**(11 Suppl 2): p. 2983-9.
72. Vrignaud, C., et al., *The First Case of RHCE Variant Allele in People of Southeast Asian Ancestry Based on a Novel RHCE*CE Molecular Background: RHCE*CE382A*. Transfusion, 2014. **54**(S): p. 146.
73. Green, C., et al., *A Silent Mutation 939G>A in RHCE (Pro313) Causes Loss of A Splice Site and Complete Skipping of Exon 6 Resulting in Expression of A Novel E Antigen*. Transfusion Medecine, 2010. **20**(S1): p. 26-54.

74. Kormoczi, G.F., E.A. Scharberg, and C. Gassner, *A novel KEL*1,3 allele with weak Kell antigen expression confirming the cis-modifier effect of KEL3*. Transfusion, 2009. **49**(4): p. 733-9.
75. Wester, E.S., et al., *KEL*02 alleles with alterations in and around exon 8 in individuals with apparent KEL:1,-2 phenotypes*. Vox Sang, 2010. **99**(2): p. 150-7.
76. **Silvy, M., et al., *New KEL*01M and KEL*02M alleles: structural modeling to assess the impact of amino acid changes*. Transfusion, 2016. 56(5): p. 1223-9.**
77. Polin, H., et al., *Identification of a novel Kmod -1 allele encoded by 977C>T (Pro326Leu)*. Transfusion, 2014. **54**(8): p. 2130-1.
78. Poole, J., et al., *A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL1 antigen*. Transfusion, 2006. **46**(11): p. 1879-85.
79. Ji, Y., et al., *Novel alleles at the Kell blood group locus that lead to Kell variant phenotype in the Dutch population*. Transfusion, 2015. **55**(2): p. 413-21.
80. Danger, Y., et al., *Characterization of a new human monoclonal antibody directed against the Vel antigen*. Vox Sang, 2016. **110**(2): p. 172-8.
81. Hennion, M.V., F.; Narboux, C.; Adjrad, L.; Courbil, R.; Fabra, C.; Peyrard, T., *Mise en place d'un dépistage de masse du phénotype rare VEL négatif sur automate de groupe sanguin à haute cadence PK7300 en qualification biologique des dons*. Transfusion Clinique et Biologique, 2017. **24**(3S): p. 306.
82. Wieckhusen, C., et al., *Molecular Screening for Vel- Blood Donors in Southwestern Germany*. Transfus Med Hemother, 2015. **42**(6): p. 356-60.

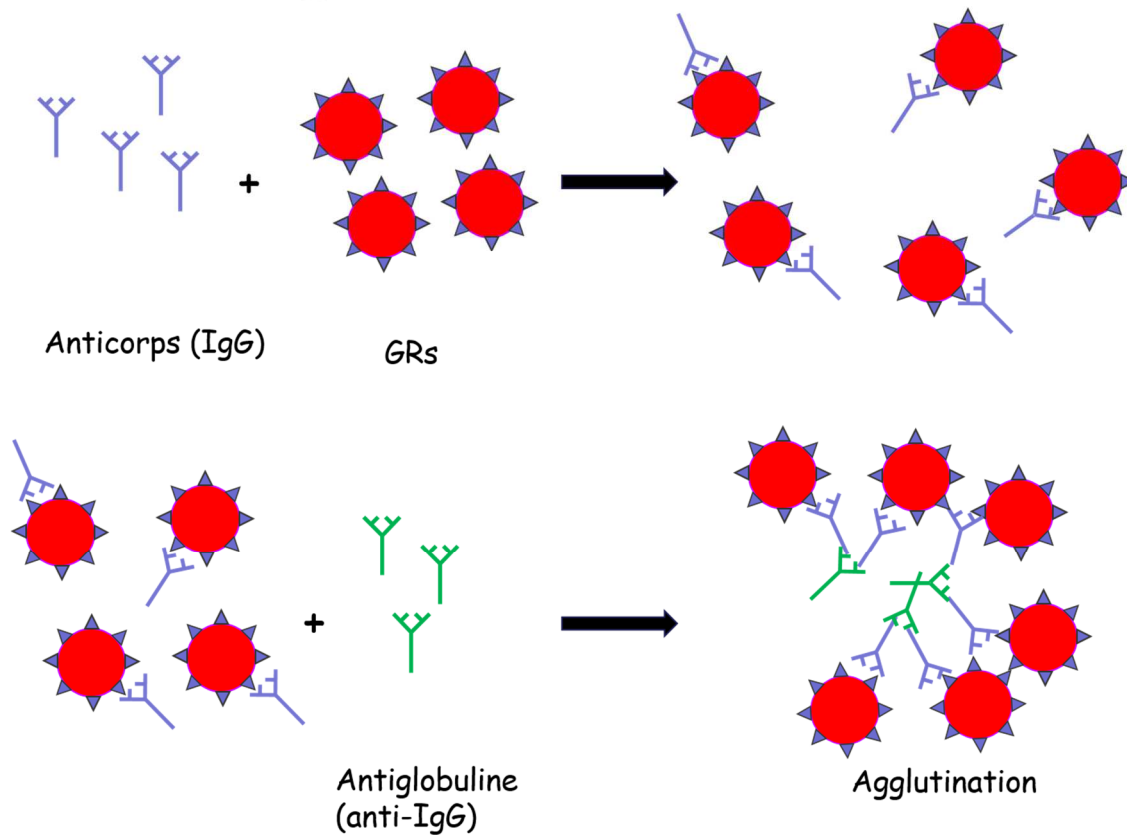
ANNEXE

Annexe 1 : Techniques d'agglutinations

Test direct d'agglutination



Test indirect d'agglutination



Annexe 2 : Variants RHD et RHCE détectés par les kits RHD et RHCE BeadChip.

Nomenclature BeadChip	Nomenclature ISBT	Nomenclature BeadChip	Nomenclature ISBT
possible D ⁹	RHD*01	DBS0	RHD*05.03
1227A (Del)	RHD*01EL.01	DV de type 4	RHD*05.04
Délétion RHD	RHD*01N.01	DV de type 6	RHD*05.06
RHD-CE(3-9)-D	RHD*01N.04	DV de type 8	RHD*05.08
RHD-CE(3-7)-D	RHD*01N.06	DV de type 9	RHD*05.09
RHD-CE(4-7)-D	RHD*01N.07	DVI	RHD*06
48A (W16X)	RHD*01N.08	DAR	RHD*09.01
807G (Y269X)	RHD*01N.18	DAR-E	RHD*09.02
D faible de type 1	RHD*01W.1	D faible de type 4.0 ou 4.3	RHD*09.03 ou RHD*09.05
D faible de type 1.1	RHD*01W.1.1	D faible de type 4.1	RHD*09.04
D faible de type 14 ou 40 ou 51	RHD*01W.14 ou RHD*01W.40 ou RHD*01W.51	DAU1	RHD*10.01
D faible de type 17	RHD*01W.17	DAU2	RHD*10.02
D faible de type 2	RHD*01W.2	DAU3	RHD*10.03
D faible de type 47	RHD*01W.47	DAU4 ou DV de type 5	RHD*10.04 ou RHD*05.05
D faible de type 29	RHD*01W.29	DAU5 ou DV de type 1 ou DBS2	RHD*10.05 ou RHD*05.01 ou RHD*13.02
D faible de type 3	RHD*01W.3	D faible de type 11	RHD*11
D faible de type 34	RHD*01W.34	DOL ou DOL2	RHD*12.01 ou RHD*12.02
D faible de type 41	RHD*01W.41	DOL3	RHD*12.03
D faible de type 5	RHD*01W.5	DBT1	RHD*14.01
DIIIa	RHD*03.01	DBT2	RHD*14.02
DIIIb	RHD*03.02	D faible de type 15	RHD*15
DIIIc	RHD*03.03	DCS1 ou DFV	RHD*16.01 ou RHD*30
DIII de type 4	RHD*03.04	DCS2	RHD*16.02
DIII de type 6 ou DIII de type 7	RHD*03.06 ou RHD*03.07	DFR ou DFR3	RHD*17.01 ou RHD*17.03
DIII de type 7	RHD*03.07	DFR2	RHD*17.02
DIVa	RHD*04.01	DFR4	RHD*17.04
DIVa de type 2	RHD*04.02	DHMi	RHD*19
DIV de type 3	RHD*04.03	IVS3+1G>A (Del)	RHD*208
DIV de type 4	RHD*04.04	DNB	RHD*25
DIV de type 5 ou DIVb	RHD*04.05 ou RHD*04.06	DUC2	RHD*37
DIVb	RHD*04.06	DIIIa-CE(4-7)-D ⁶⁶	N/A [6]
RHD psi	RHD*04N.01	RHCE(1-3)-D(4-10)	N/A [7]
DV de type 2 ou DBS1	RHD*05.02 ou RHD*13.01	ceHAR	RHCE*01.22
DV de type 2 ou DBS1 ou DV de type 7	RHD*05.02 ou RHD*13.01 ou RHD*05.07	Délétion RHD (possible rG)	RHD*01N.01 (possible RHCE*02.03)

Nom conventionnel	Nom ISBT
WT(ce)	RHCE*01
WT(Ce)	RHCE*02
WT(cE)	RHCE*03
WT(CE)	RHCE*04
ce(48C)	RHCE*01.01
ceTI	RHCE*01.02
ce(1025T)	RHCE*01.03
ceAR	RHCE*01.04
ceEK	RHCE*01.05
ceMO	RHCE*01.07
ceBI ou ceSM	RHCE*01.08 ou RHCE*01.09
ceSL	RHCE*01.10
ceRT	RHCE*01.11
ceRA	RHCE*01.12
ce(733G)	RHCE*01.20.01
ce(48C,733G)	RHCE*01.20.02
ce(48C,733G,1006T)	RHCE*01.20.03
ce(48C,733G,1025T)	RHCE*01.20.04
ce(733G,1006T)	RHCE*01.20.05
ceCF	RHCE*01.20.06
ce(697G,733G)	
ceJAL	RHCE*01.20.07
ce(48C,340T,733G)	
ce(48C,733G,748A)	RHCE*01.20.08

Nom conventionnel	Nom ISBT
ce(733G,748A)	
ceHAR	RHCE*01.22
CeMA	RHCE*02.01
CeFV	RHCE*02.02
Ce(365T)	RHCE*02.03
CeVA	RHCE*02.04
CeCW	RHCE*02.08.01
ce(48C,122G)	
CeCX	RHCE*02.09
ce(48C,106A)	
CeRN	RHCE*02.10.01
Ce(344G)	RHCE*02.12
cEEW	RHCE*03.01
cEFM	RHCE*03.03
ce(602C)	RHCE*03.04
ceKH	RHCE*03.05
ce(344C)	RHCE*03.07
(48C,712G,733G)	
(340T,344G)	
ce(48C,697G,733G,1006T)	
ce(48C,697G,712G,733G,916T)[12]	
ce(48C,733G,744C)	
Ce(667T)	
ce(365T)	

Annexe 3 : Amorces de PCR utilisées pour l'amplification des 10 exons des gènes *RHD* et *RHC*.

Gène	Exon	Sens(S)/ Anti-sens(AS)	Séquence amorce PCR (5'>3')	Taille amplicons (pb)
<i>RHD</i>	1	S	CACAGGGGAAGTTGGCTGC	1179
		AS	AGAAGATGGGGGAATCTTTTCCTT	
	2	S	TGACGAGTGAAACTCTATCTCGAT	1590
		AS	GGCATGTCTATTTCTCTCTGTCTAATT	
	3	S	TCTTCTATTCCACAGAAAGTAGG	607
		AS	TCTTGCTATGTTGCCAGCTCGG	
	4	S	TGGCAAGAACCTGGACCTTGACTTT	1626
		AS	TCCTGAACCTGCTCTGTGAAGTGC	
	5	S	TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG	656
		AS	ACTACCCCAGAAAAGCCTTTG	
	6	S	AGCAGGGAGGATGTTACAG	289
		AS	TTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	
	7	S	CATCCCCCTTTGGTGGCC	405
		AS	AAGGTAGGGGCTGGACAG	
	8	S	CTGGAGGCTCTGAGAGGTTGAG	465
		AS	CCTGGCAATGGTGGAAAGAAAG	
	9	S	TACTGTCGTTTTGACACACAATATTTT	487
		AS	CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC	
	10	S	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT	382
		AS	AGCTTACTGGATGACCACCA	
<i>RHCE</i>	1	S	CACATGGATGGGAGCACAGTTC	1182
		AS	AGAAGATGGGGGAATCTTTTCCTC	
	2	S	TGACAAGAGTGAAACTCTATCTCAA	1425
		AS	GTAAAATACAGGATGCCAGTTA	
	3	S	TCTTCTATTTCCACAGAAAGTAAGG	567
		AS	TCTTGCTATATTGCCAGGTTCA	
	4	S	CCAGCCTGAGCAACATAATG	762
		AS	GGTCCCTAAAAGGAAGTGCTTA	
	5	S	GCAACAGAGCAAGAGTCCA	690
		AS	ACTCCCCCAGAAAAGCCTTTG	
	6	S	GGCAGTAGTGAGCTGGCCACCG	446
		AS	GAATGCACCAACACCTGCCTAATGC	
	7	S	CTACTCATAGTGTGGTCCGTAGATG	583
		AS	AAGGTAGGGGCTGGACAT	
	8	S	CTGGAGGCTCTGAGAGGTTAAA	465
		AS	CCTGGCAATGGTGGAAAGAAAG	
	9	S	CACTGTCGTTTTGACACACACAATATTT	489
		AS	CACCCGCATGTCAAACCTATTTGGC	
	10	S	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT	385
		AS	AATTGTCAATAAAATTAACCCAAAACCTT	

Annexe 4 : Amorces de PCR utilisées pour l'amplification des 19 exons du gène *Kell*.

Gène	Exon	Sens(S)/ Anti-sens(AS)	Séquence amorce PCR (5'>3')	Taille amplicons (pb)
<i>Kell</i>	1 et 2	S	TTGCTTGGGGAGTGAAGACT	787
		AS	GTTTTGGGTGAGGATGAAGC	
	3 et 4	S	AGGGACTGTAGCACCAACAGA	825
		AS	CCCATCATCTCCAATCATCC	
	5 et 6	S	TCAAAATGTGGCAAAGAAACA	998
		AS	TGTCCCTGACTTTCACATCAA	
	7, 8 et 9	S	CCAATCTTTGTGTCCATCTCC	973
		AS	CAGGTGGCAGGTTCTCTTA	
	10	S	TTAATACAGAGGAGAAGGAGCTG	385
		AS	ATGGAAAGCCAAGACATGGA	
	11	S	TGCATCACCCCTAAGGGATAGT	396
		AS	CTCAGTGGCCCTTCTCTGAC	
	12 et 13	S	CTGCCTTCCTTTCTCCACAG	843
		AS	GCCCAGACAAGTCACAGGAT	
	14 et 15	S	TGGGCTGCTCTCTCCTAATC	693
		AS	CCAAAGTTCACGGCTCTAGG	
	16 et 17	S	GCTATCCCAGGTATGGGTCA	757
		AS	CCGTCTATTCAGTGGGGATG	
	18	S	TGGCTCAGATCAACTAGTCAGTG	383
		AS	GGGTAGGGAGGGAAGAGAAA	
	19	S	CACTTGATCCCCTGGTTCC	568
		AS	CTTCAAACCCACCAGGTCAC	

Annexe 5

Allèles <i>RHD</i> retrouvés par la technique Bioarray	n=
D faible type 11	13
DIIIa	6
DFR2	6
DAU2	2
DVI type 2	2
RHDIIIa-CE(4-7)-D	2
D faible type 15	2
DAU5	2
DFR ou DFR3	1
D faible type 5	1
DBT1	1
DBT2	1
DOL-2	1
DNB	1

Allèles <i>RHD</i> déjà décrits retrouvés au séquençage	n=
D faible type 10	7
D faible type 18	5
D faible type 25	2
DAU0	2
DV type 7	1
RHD-CE(5-6)-D	1
D faible type 29	1
D faible type 31	1
D faible type 38	1
D faible type 39	1
D faible type 51	1
D faible type 59	1
D faible type 61	1
D faible type 78	1
DLO	1
RHD(93insT)	1
RHD(A85G)	1
RHD(L390P)	1

Annexe 6

Allèles <i>RHCE</i> retrouvés par la technique Bioarray	n=
CeVA	4
CeMA	3
ces(1006) dans l'haplotype (C)ceS_type 1	3
ces(1006) dans l'haplotype (C)ceS_type 2	3
ce en haplotype avec DAU-5	3
CeCW	1
Ce(667)	1

Allèles <i>RHCE</i> déjà décrits retrouvés au séquençage	n=
Associés à un affaiblissement C ou C et e	
RHCE*Ce(IVS3-5G)	2
RHCE*Ce(M295I)	1
RHCE*Ce(S122L)	1
RHCE*Ce(M167R)	1
Allèle Ce confirmé au séquençage	4
Ce(667)	1
Associés à un affaiblissement e	
RHCE*ce(P221R)	1
RHCE*ce(48C,1170T,1193A)	2
Allèle ce confirmé au séquençage	1
Associés à un affaiblissement c	
RHCE*cE(I225N)	1
Allèle ce confirmé au séquençage	7
Associés à un affaiblissement E	
cEju	2
RHCE*cE(1130T)	2
RHCE*cE(916G)	2
Allèle cE confirmé au séquençage	3

New silent and *weak D* alleles: molecular characterization and associated antigen density

Lugdivine Filosa,¹ Sophie Beley,^{1,2} Jacques Chiaroni,^{1,2} Pascal Bailly,^{1,2} and Monique Silvy^{1,2}

RhD is one of the most clinically important blood group antigens in the field of transfusion and prevention of fetomaternal incompatibilities. New variant *RHD* alleles are regularly identified and their characterization is essential to ensuring patient safety. In an effort to expand the known *RHD* repertoire, the purpose of this report is to present five novel variant *RHD* alleles.

BRIEF METHODS

Samples reported to show D phenotype ambiguity by routinely used serologic analyses (n = 5) were referred for characterizing the molecular basis of unusual D phenotypes. A sixth sample was investigated for confirming serologic rare D-C+E-c-e+ phenotype. Genomic DNA was extracted from 200-μL whole blood samples using a DNA extraction kit (QIAamp Blood DNA mini kit, Qiagen) and first-intention genotyping was performed with a *RHD* genotyping kit (*RHD* BeadChip kit, BioArray Solutions, Immucor France). Sequencing of the 10 exons of *RHD* was performed as previously described.¹ Antigen density per RBC was measured by flow cytometry using P3X249, LHM76/55, P3X241, and LHM169/80 antibodies (targeting Epitopes 2.1, 3.1, 5.4, and 6.3, respectively) as previously reported.¹

Functional prediction of nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms was performed by using the PolyPhen-2 algorithm (Polymorphism Phenotyping Version 2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), which annotates the nonsynonymous coding single-nucleotide polymorphisms by a metric functional prediction score that can be categorized to distinguish benign mutations from damaging ones affecting protein function.

RESULTS

Since the *RHD* BeadChip kit failed to detect any change, *RHD* exons were sequenced to resolve typing inconsistency. Sequencing revealed six new *RHD* alleles bearing substitution(s) that occurred within the *RHD* coding sequence (Table 1). Five samples had a single-nucleotide substitution, that is, c.73A>T (p.Ile25Phe), c.143A>G (p.Tyr48Cys), c.668T>C (p.Phe223Ser), c.761C>G

(p.Ser254X), or c.1229T>C (p.Phe410Ser), and one had two polymorphisms, c.105C>G and c.1195G>A (p.Asp35Glu, p.Ala399Thr). All new alleles were homozygous (or hemizygous) except *RHD*(73T) which was found in *trans* to *RHDpsi*. No data about ethnicity of patients or donors were available except for the patient with *RHD*(668C) who was from African ancestry.

The c.761C>G transversion is predicted to encode a premature stop codon in RhD confirming the D- phenotype. Other amino acid changes encoded by the new alleles were located in the transmembrane or intracellular segments of the RhD protein,¹ a finding consistent with the characteristic location of weak D phenotypes. RhD antigen densities per RBC were ranging from 450 to 8804. PolyPhen-2 analysis predicted that Ile25Phe, Asp35Glu, and Ala399Thr changes are benign while Tyr48Cys, Phe223Ser, and Phe410Ser are probably damaging (Table 1).

Amino acid changes located in M0 and M1 according to previously reported modeling² may affect structure and/or stability at membrane level either directly the folding of the single RhD subunit or intersubunit interactions. Since Ile25Phe and Asp35Glu are predicted to be benign, both changes are more likely to affect intersubunit interactions. Conversely, Tyr48Cys change is most likely to

From the ¹Laboratoire d'Hématologie Moléculaire: Biologie des Groupes Sanguins, Établissement Français du Sang Alpes Méditerranée, and ²UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille Université-EFS-CNRS, Marseille, France.

Address reprint requests to: Monique Silvy, PhD, Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, Faculté de Médecine Timone aile rouge 4^{ème} étage, EFS Alpes Méditerranée, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; e-mail: monique.silvy@efs.sante.fr.

This study was funded by Établissement Français du Sang, France.

Received for publication January 25, 2016; revision received March 30, 2016; and accepted April 4, 2016.

doi:10.1111/trf.13655

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56:2154–2155

TABLE 1. New *RHD* variants

Allele	Nucleotide changes	Exon	Amino acid changes	Predicted location*	Polyphen prediction [score, sensitivity, specificity]	RhCE phenotype	RhD antigens per RBC	GenBank Accession No.
<i>RHD</i> (73T)	c.73A>T	1	Ile25Phe	M0	Benign [0.108, 0.91, 0.69]	C-E-c+e+	648	LN999838
<i>RHD</i> (105G, 1195A)	c.105C>G; c.1195G>A	1 9	Asp35Glu Ala399Thr	M0; ICL7	Benign [0.416, 0.84, .079] Benign [0.065, 0.92, 0.65]	C+E-c+e+	8804	LN999839
<i>RHD</i> (143G)	c.143A>G	1	Tyr48Cys	M1	Probably damaging [0.992, 0.49, 0.95]	C-E+c+e+	468	LN999840
<i>RHD</i> (668C)	c.668T>C	5	Phe223Ser	M6	Probably damaging [0.87, 0.72, 0.89]	C-E-c+e+	450	LN999841
<i>RHD</i> (761G)	c.761C>G	5	Ser254X	M7	NA	C+E-c+e+	Negative†	LN999842
<i>RHD</i> (1229C)	c.1229T>C	10	Phe410Ser	ICL7	Probably damaging [0.965, 0.62, 0.93]	C+E-c+e+	708	LN999843

* Transmembrane helices are labeled from M0 to M11.

† Negative determination by microplate direct hemagglutination test using a Qwalys system (Diagast) with Clone P3X61.

ICL = intracellular loop; NA = not applicable.

impact the single RhD subunit. Ala399Thr and Phe410Ser are located in the cytoplasmic tail of the protein (ICL7). These substitutions are located in the Rh-ankyrin complex known to display amino acid changes associated with the deficiency of RhD antigen expression.³ This view is consistent with the Polyphen2 prediction regarding the Ala399Thr change. Moreover, the c.1229T>C transition encoding Phe410Ser change is located within the Exon 10 consensus acceptor splice site and this transition could affect splicing on *RHD* mRNA as suggested for c.1228T>G change observed in *weak D type 78* variant.⁴ Replacement of phenylalanine by serine at Position 223 is predicted to occur in the fifth transmembrane segment (M4) and is predicted to possibly damage protein function. Phe223 is an aromatic hydrophobe amino acid involved in extracellular vestibule and its replacement by a small uncharged polar amino acid could explain the lower antigen density observed (450 antigens/RBC).² Of note, the presence of a valine at this position (*DFV* allele) leads to an almost normal RhD expression (9268 antigens/RBC).⁵

The assignment of most of these new and rare alleles as weak D alleles was based on a combined consideration of the existence of a doubtful D phenotype, the location of predicted amino acid changes in the RhD protein, the functional prediction, and the number of D antigens per cell. Nonetheless, this should be regarded as speculative

until more data are available in patients with such variants who are transfused with D+ RBCs.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Silvy M, Chapel-Fernandes S, Callebaut I, et al. Characterization of novel RHD alleles: relationship between phenotype, genotype, and trimeric architecture. *Transfusion* 2012;52:2020-9.
2. Callebaut I, Dulin F, Bertrand O, et al. Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfus Clin Biol* 2006;13:70-84.
3. Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, et al. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem* 2003;278:25526-33.
4. Silvy M, Simon S, Gouvitsos J, et al. Weak D and DEL alleles detected by routine SNaPshot genotyping: identification of four novel RHD alleles. *Transfusion* 2011;51:401-11.
5. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, et al. DCS-1, DCS-2, and DFV share amino acid substitutions at the extracellular RhD protein vestibule. *Transfusion* 2008;48:25-33. ■

New *KEL**01M and *KEL**02M alleles: structural modeling to assess the impact of amino acid changes

Monique Silvy,^{1,2} Isabelle Callebaut,³ Lugdivine Filosa,¹ Thomas Granier,^{1,2}
Jacques Chiaroni,^{1,2} and Pascal Bailly^{1,2}

BACKGROUND: The KELL antigens are carried by the well-folded and highly polymorphic glycoprotein KELL, belonging to the M13 family of metalloproteases. Anti-KEL, particularly anti-KEL1, are clinically significant. We retrospectively investigated genomic DNA from samples with uncertain KEL1 or KEL2 phenotype and identified six novel *Kmod* alleles. We then considered a model of the protein three-dimensional (3D) structure to assess the impacts of the amino acid changes.

STUDY DESIGN AND METHODS: The 19 exons of the *KEL* gene were polymerase chain reaction amplified and sequenced. Modeling was performed using the experimental 3D structure of human endothelin-converting enzyme-1 in the presence of the metabolite phosphoramidon.

RESULTS: We identified four novel *KEL**01M alleles with amino acid substitutions p.Arg447Trp, p.Gly641Arg, p.Ala645Val, and p.Gly703Arg found buried within helices of the ectodomain catalytic lobe. We also revealed one new *KEL**02M allele with p.Gly263Glu in contact with solvent (water) located within the second lobe of the ectodomain. One sample with c.575G>C transversion (p.Arg192Pro) on a *KEL**02 background showed a weakened reactivity for KEL1. According to our 3D modeling, these amino acid substitutions may have a profound impact on the protein structure.

CONCLUSION: This study is especially interesting with regard to the description of four new *KEL**01M alleles. Indeed, to date only two *KEL**01M alleles have been described and our data suggest a nonnegligible incidence of KEL1 variants. Serologic KEL2-negative results as well as any ambiguity implying either KEL1 or KEL2 in donors should always be confirmed by means of genotyping analysis and discrepancies between these methods require sequencing of *KEL* gene.

The Kell blood group system is highly polymorphic, expressing more than 38 antigens as a result of nucleotide changes in the *KEL* gene. Antibodies targeting KEL antigens have caused anemia of the fetus and newborn, as well as transfusion reactions, particularly KEL1 (K).¹ In Australia 9.5% of alloimmunized pregnant women have anti-KEL1 in their serum.² In Caucasians, the KEL1 antigen has a prevalence of approximately 9% and the KEL:1,-2 (K+k-) phenotype is rare, with a prevalence of approximately 0.2%. In France, all blood donors are phenotyped for KEL1, and blood selection is performed to comply with recipient KEL phenotype.

The *KEL* gene, located on chromosome 7q34, encompasses 19 exons distributed over approximately 21.5 kb of genomic DNA. It encodes a 93-kDa Type II transmembrane glycoprotein of 732 amino acids which is covalently linked at Cys72 to Cys347 of the XK protein in the red blood cell (RBC) membrane.³ The c.578C/T polymorphism in Exon 6 results in either Thr193 (KEL2) or Met193 (KEL1). This amino acid substitution modifies the consensus amino acid sequence for *N*-glycosylation that occurs at this site. In KEL2, Asn-Arg-Thr193 is a consensus

ABBREVIATIONS: 3D = three-dimensional; ECE-1 = endothelin-converting enzyme 1.

From the ¹Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, Biologie des Groupes Sanguins, Établissement Français du Sang Alpes Méditerranée; and the ²UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille Université-EFS-CNRS, Marseille, France; and the ³CNRS UMR7590, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris6-MNHN-IRD-IUC, Paris, France.

Address reprint requests to: Monique Silvy, PhD, Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, Faculté de Médecine Timon Aile Rouge 4^{ème} étage, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005, Marseille, France; e-mail: monique.silvy@efs.sante.fr.

This study was funded by Établissement Français du Sang, France.

Received for publication July 29, 2015; revision received December 10, 2015; and accepted January 20, 2016.

doi:10.1111/trf.13553

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56:1223–1229

sequence for *N*-glycosylation of Asn191, whereas Asn-Arg-Met in KEL1 is not.⁴ The consequence is an inactive KEL1 protein in contrast to KEL2 antigen displaying enzymatic properties resembling those of members of the M13 family of metalloproteases.⁴ Besides KEL, the M13 family also comprises endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1), neprilysin, soluble secreted endopeptidase, phosphate-regulating endopeptidase homologue X-linked, and damage-induced neuronal endopeptidase.

Rare cases of K₀ phenotype associated with silencing of *KEL* gene have been reported among Caucasian, black, and Asian populations and to date more than 25 null alleles are known.⁵ The lack of expression of KEL antigens is associated with an enhanced strength of Kx antigen while XK protein level is decreased.¹ Weakened KEL antigens may be found in individuals with absent XK protein expressions (McLeod phenotype).⁶ The rare X-linked McLeod syndrome is a neuroacanthocytosis disorder with hematologic, neuromuscular, and central nervous system manifestations. However, several individuals have been described with exclusive McLeod RBC phenotype without other hematologic, neuropsychiatric, or neuromuscular symptoms. The most frequent reasons for unusual KEL phenotypes are either a cis-modifier effect of KEL3 or expression of one of a dozen altered *Kmod* alleles identified.⁷⁻⁹ Mismatched transfusion to K₀ and K_{mod} individuals elicits antibody production. Indeed, those with a K₀ phenotype produce anti-Ku (anti-KEL5), an antibody directed against the KEL glycoprotein, while those with a K_{mod} phenotype produce Ku-like antibodies. Ku-like antibodies react with all RBCs except those with K₀ phenotype and are directed against specific amino acid substitutions. As a result, Ku-like antibodies produced by patients with different molecular background are not always compatible.¹⁰ *KEL*02N* and *KEL*02M* alleles have an estimated cumulative frequency of 0.10% (95% confidence interval, 0.04-0.26) in Austria.¹¹

Certain amino acid changes in the well-folded protein KEL may cause its conformational change and thereby affect the accessibility of the epitope site to anti-KEL. Alternatively, an amino acid substitution may affect the stability of the protein or its ability to reach the cell membrane. Such effects have been experimentally proven in K_{mod} with p.Tyr677Cys, p.Leu329Arg, and p.Gly703Arg (encoded by *KEL*02M.02*, *KEL*02M.03*, and *KEL*02M.04* alleles, respectively).⁹ We retrospectively investigated genomic DNA from samples with uncertain KEL1 or KEL2 phenotype and identified six novel *Kmod* alleles. We also considered a model of the three-dimensional (3D) protein structure to assess the impacts of the amino acid changes.

MATERIALS AND METHODS

Blood sampling and serologic testing

EDTA blood samples from either blood donors (Donors 2 and 5) or patients (Donors 1, 3, 4, and 6) were addressed

to our laboratory for genotyping investigation of an altered expression of KEL antigens. Samples showed uncertain KEL1 (Samples 1 to 5) or KEL2 (Sample 6) reactivity.

KEL phenotyping was performed by microplate direct hemagglutination test using either a Qwalys system (Dia-gast) or an automated microplate system (Model PK7300, Olympus). The clones used are reported in Table 1. Complementary investigations were performed using either the gel test (Innova, Ortho Clinical Diagnostics) or the saline tube technique. KEL1 reactivity was analyzed using anti-KEL1 monoclonal antibodies MS56, AEK4, and 601 and KEL2 reactivity using a human polyclonal antibody and monoclonal Lk1 (Mast Diagnostic).

Genomic analysis of *KEL*

Genomic DNA was extracted from 200 µL of whole blood using the blood DNA mini kit (QIAamp Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Genotyping for *KEL* was performed using a RBC kit (LIFE-CODES, Gen-Probe) according to the manufacturer's instructions. The 19 exons of the *KEL* gene were polymerase chain reaction (PCR) amplified and sequenced (primer sequences are available in Table S1, available as supporting information in the online version of this paper), using for comparison the reference sequence for *Homo sapiens* Chromosome 7, GRCh37.p5 Primary Assembly, GenBank Accession Number NC_000007 (*KEL*02*, *KEL*04*, and *KEL*07*).

3D structure modeling

The search for possible templates in modeling the 3D structure of human KEL was performed using Phyre2.¹² This highlighted with 100% confidence four different 3D structures of neutral endopeptidases (pdb 1DMT(A), 3DWB(A), 3ZUK(B), and 4IUW(A)), sharing with human KEL between 18 and 32% sequence identity (86% to 89% of protein coverage). The experimental 3D structure of human ECE-1 in the presence of the metabolite phosphoramidon (pdb 3DWB, 2.38 Å resolution)¹³ was chosen for modeling for its highest sequence identity with KEL1 (32%) and the fact that it was solved in complex with a metalloproteinase inhibitor. Modeling was performed using computer software (Modeler, Version 9.14, <https://salilab.org/modeller/9.15/release.html>)¹⁴ and 3D visualization using another computer program (Chimera, <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).¹⁵

RESULTS

Serologic results

Six samples were addressed to our laboratory for discrepant results in routine phenotyping for KEL1 antigens (Samples 1 to 5) or KEL2 (Sample 6). Results from serologic testing are shown in Table 1. One sample expressed

TABLE 1. New alleles discovered in the investigated samples: molecular changes and associated antibody reactivity

Affected antigen	Donor (D)/patient (P)	Sample	Genotype for <i>KEL</i> *01 <i>KEL</i> *02	Alleles*	SNPs in samples	Amino acid change(s)	Immunohematology results for affected antigen			Accession number
							Technique	Clone	Reactivity	
KEL1	P	1	<i>KEL</i> *01/*02	<i>KEL</i> *01M.03 <i>KEL</i> *02	c.578C/T†	p.Thr193Met†	MDAT (Q)	MS56	–	LN899832
					c.1339C/T	p.Arg447Trp	Gel (Innova)	MS56	3+	
					c.1680A/C	p.Pro560Pro	Tube	AEK4	0.5+	
					c.578C/T†	p.Thr193Met†	MDAT (O)	MS56	–	
					c.1920G/C	p.Gly640Gly	MDAT (O)	601	+	
	D	2	<i>KEL</i> *01/*02	<i>KEL</i> *01M.04 <i>KEL</i> *02	c.1921G/A	p.Gly641Arg	MDAT (Q)	MS56	–	LN899833
					c.578C/T†	p.Thr193Met†	Gel (Innova)	MS56	2+	
					c.1899A/G	p.Leu633Leu				
					c.1934C/T	p.Ala645Val				
					c.578C/T†	p.Thr193Met†	Gel (Innova)	MS56	0.5+/1+	
KEL2	D	5	<i>KEL</i> *02/*02	<i>KEL</i> *02M.15 <i>KEL</i> *02	c.1680A/C	p.Pro560Pro	MDAT (O)	MS56	–	LN899836
					c.2107G/C	p.Gly703Arg	MDAT (O)	601	+	
					c.575G/C	p.Arg192Pro	Tube	poly	3+	
	P	6	<i>KEL</i> *01/*02	<i>KEL</i> *02M.16 <i>KEL</i> *01	c.578C/T†	p.Thr193Met†	Gel (Innova)	Lk1	–	LN899837
					c.788G/A	p.Gly263Glu				

* Alleles assignment was provided by ISBT.

† Nucleotide and amino acid change distinguishing *KEL**01 and *KEL**02 alleles
MDAT = microplate direct agglutination test; (Q) = Qwalys; (O) = Olympus PK.

a repeatedly weak KEL1 reactivity (Sample 4, 0.5+ and 1+) while all others showed inconsistent reactivity ranging from negative to 3+ depending on the reagent and/or the technique used.

Molecular analysis of *KEL*

We first tested the genomic DNA for *KEL**01/*02/*03/*04/*06/*07/*21 alleles using the LIFE-CODES RBC kit. All samples were homozygous for *KEL**04 and *KEL**07. Sample 5 was homozygous for *KEL**02 while all others were heterozygous for *KEL**01 and *KEL**02 alleles. PCR amplification and sequencing of the 19 exons of *KEL* gene enabled the identification of novel heterozygous polymorphisms, which we assigned to the *KEL**01 or *KEL**02 allele based on phenotype inconsistency. Unfortunately, there was no blood sample available to perform RNA sequencing and confirm the deduced genotype. All samples had a heterozygous missense polymorphism in one of Exons 6, 8, 12, 17, or 19 (Table 1). Four of six also had a synonymous polymorphism that was c.1680A>C in Exon 15 (p.Pro560Pro, Samples 1 and 4), c.1899A>G in Exon 17 (p.Leu633Leu, Sample 3), or c.1920G>C in Exon 17 (p.Gly640Gly, Sample 2).

Model of the 3D structure of human *KEL* polypeptide

Homology modeling can result in high-quality models as long as the target and the template are sufficiently related, as was the case here. Indeed, the model of the 3D structure of KEL and the experimental 3D structure of human ECE-1 are similar, as highlighted by a root mean square deviation of 0.64 Å (541 superimposed C α atoms, 32% sequence identity; Fig. 1). The ectodomain is composed of two largely helical domains, forming two lobes (Domains 1 and 2) connected by intertwining segments (Fig. 2). Centrally located at the interface of these domains is a roughly spherical cavity bearing the well-conserved catalytic site (zinc-binding amino acid residues are indicated by stars on the sequence alignment in Fig. 1). Worth noting is the presence, in loops at the entrance of this central cavity, of most of the few insertions/deletions (I/D labels on Fig. 1). The *KEL**01 and *KEL**02 alleles are likely to adopt a similar 3D structure, the only amino acid difference (Met193 (*KEL**01) or Thr193 (*KEL**02)) being located at the level of the buried face of helix E2, in the vicinity of the end of helix B2 (yellow on Fig. 2A). In our model, the side chain oxygen atom of Thr193 interacts with main chain atoms, contributing to the stabilization of helix. Amino acid substitutions p.Arg447Trp, p.Gly641Arg, p.Ala645Val, and p.Gly703Arg are located buried within helices in the catalytic domain (pink on Fig. 2A), while p.Arg192Pro and p.Gly263Glu are in contact with solvent (water) within the second lobe of the ectodomain (purple on Fig. 2A).

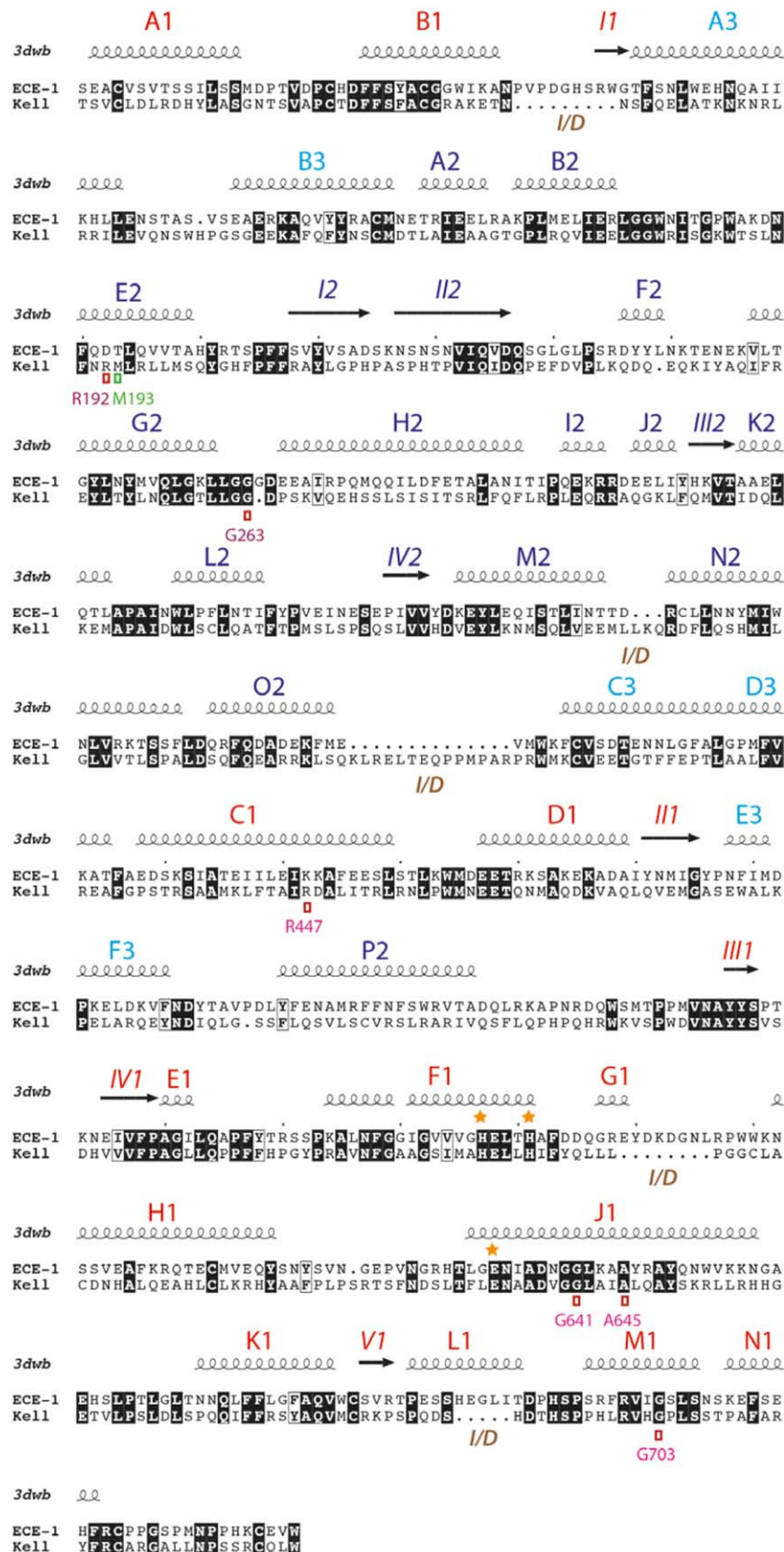


Fig. 1. Alignment of the amino acid sequences of human KEL and of human ECE-1 the 3D structure of which has been solved (pdb 3dwb). The observed secondary structures of human ECE-1 are reported above the alignment. The secondary structures of the catalytic domain (1) are shown in red, those of the smaller domain (2) in blue, and those of the three interdomain-linking fragments (3) in cyan. Amino acids discussed here are indicated with squares and those involved in zinc binding are highlighted with stars.

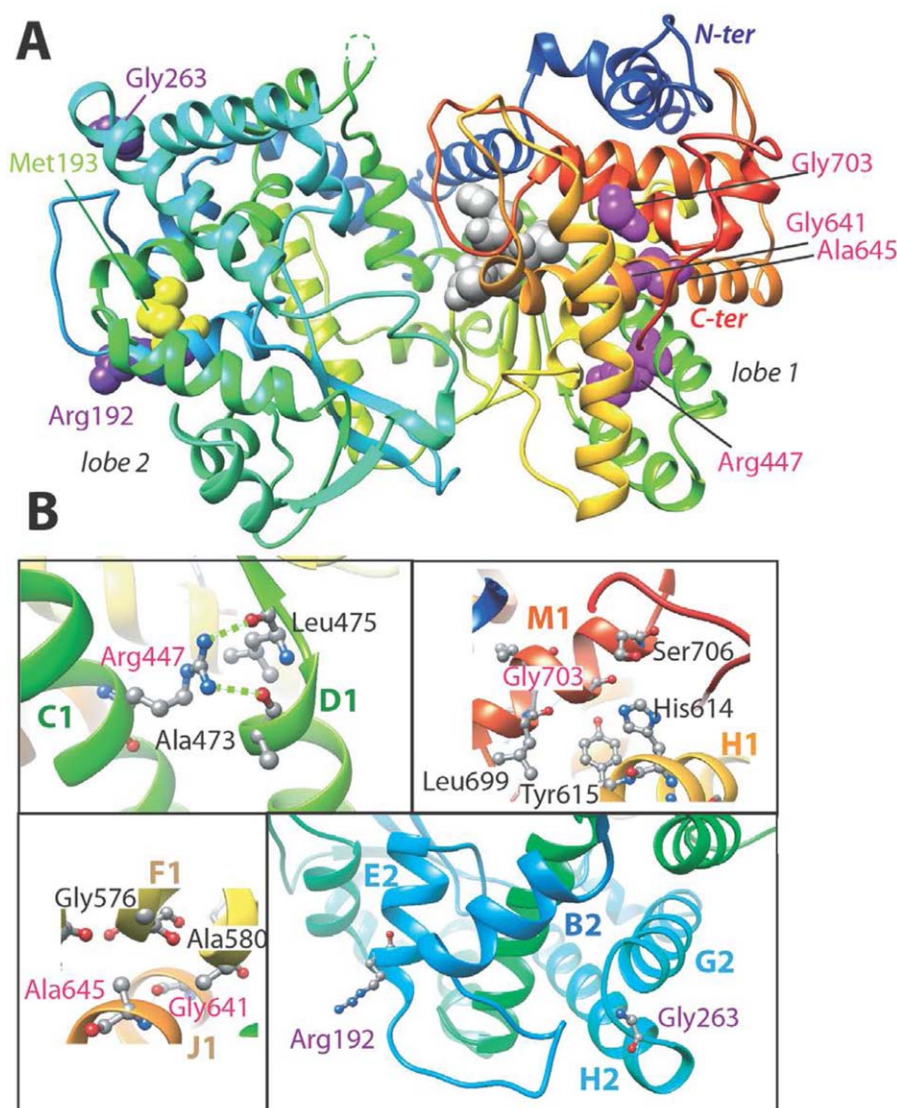


Fig. 2. Model of the 3D structure of the KEL protein. The modeled structure shows the amino acids (Arg447, Gly641, Ala645, Gly703, Arg192, and Gly263), the substitutions of which are associated with new allelic KEL variants, as well as the position of Met193. The catalytic lobe (Lobe 1) and the second lobe (smaller) are indicated. (A) Global view, highlighting the central cavity where the catalytic site lies (phosphoramidon is shown in gray). (B) Magnification on the different amino acid residues.

Arg447 is located in helix C1 and the nitrogen atoms of the arginine side chains establish hydrogen bonds with the carbonyl oxygen atoms of Ala473 and Leu475 (Fig. 2B left upper view). Gly703 is located buried within helix M1, with no room to accommodate any other side chain without steric hindrance (Fig. 2B right upper view). Gly641 and Ala645 are located in helix J1 within the VGGLAIALQA sequence and are respectively opposite A580 and G576 located within the GAAGSIMA sequence of helix F1, an area in which a tight packing between the two helices is observed (Fig. 2B left lower view). In contrast, according to our model, Gly263 and Arg192 are, respectively, located in the loop between the H2 and G2 helices and at the

amino-terminal extremity of helix E2 and are in contact with solvent (Fig. 2 right lower view).

DISCUSSION

In addition to the ABO and RH blood group systems, the Kell system including the two antithetical antigens KEL1 and KEL2, has considerable clinical importance with regard to the frequent appearance of anti-KEL alloantibodies. Maximum efforts should be made to avoid anti-KEL-driven adverse reactions through accurate typing in pregnancies or in donors and recipients. The estimated

cumulative *KEL*02N* and *KEL*02M* allele frequencies among the general population in Austria is 0.1%,¹¹ but higher frequency of *KEL*02N* has been reported in France based on investigation of 121 unrelated individuals referred to the CNRGS for confirmation of their *KEL*:−2 (k−) phenotype.^{11,16} Genotyping has contributed to elucidating the antigen status in individuals with uncommon polymorphisms in the *KEL* gene.^{17–22} In this report we described six novel *Kmod* alleles, four of which we found on a *KEL*01* background, representing a significant addition to the known *KEL*01M* repertoire since only two *KEL*01M* alleles were previously described.^{19,23}

By modeling the 3D structure of KEL1 protein and in particular by highlighting the differences in its variants at the structural level, we have contributed to the understanding of the reduction of KEL1 reactivity. Indeed, the Arg to Trp substitution at Position 447 located in protein helix C1 (Sample 1) would be expected to dramatically affect the 3D structure. Indeed, while Arg can establish hydrogen bonds with the oxygen main chain atoms of Leu475 and Ala473, Trp (large and aromatic) cannot (Fig. S1A, available as supporting information in the online version of this paper). Moreover the introduction of such a bulky side chain would not be allowed without steric clashes with helix D1 (Fig. S1A). Replacing Gly641 by Arg or Ala645 by Val (Samples 2 and 3, respectively) may affect the compact interhelix packing between helices F1 and J1 and thus also result in a less stable or poorly structured protein (Fig. S1C). In Sample 4, the Gly-to-Arg substitution at Position 703 in M1 helix involves the incorporation of a larger, positively charged amino acid that could also lead to steric clashes and to folding or fold stability problems (Fig. S1B). Consistent with the repeatedly weakened reactivity observed in Sample 4 with monoclonal anti-KEL1 MS56, the same amino acid change was reported to be encoded by *KEL*02M.04* allele (c.2107G>A) and shown to alter transport of the mutant KEL protein to the cell surface.⁹ It is worth mentioning that the substitutions in Samples 1 to 4 are considered as deleterious by the SIFT algorithm,²⁴ due to their high conservation of the concerned positions in the M13 family of metalloproteases. It should be noted that these four samples also showed a synonymous polymorphism (c.1680A>C p.Pro560Pro, c.1899A>G p.Leu662Leu, or c.1920G>C p.Gly640Gly) and we cannot exclude their potential effect on either mRNA splicing or on protein expression as was recently reported for the Dombrock blood group.²⁵ Indeed, synonymous polymorphisms were shown to affect the cotranslational folding pathway and the secondary mRNA structure controlling both mRNA stability and protein translation efficiency.^{26–28}

Finally, even if the amino acids modified in KEL glycoprotein encoded by *KEL*02M.15* and *KEL*02M.16* alleles (Samples 5 and 6, respectively) remain in contact with solvent (water; Fig. 2), their substitutions may have profound impact on the structure of the protein. Indeed, the folding or

fold of the KEL protein carrying proline at Position 192 (helix E2) in Sample 5 (next to the glycosylated Asn191 in KEL1), might be affected through an impact on the hydrogen bond network. Interestingly, molecular analysis on this sample addressed for discrepancy in KEL1 reactivity revealed homozygosity for c.578C (compatible with two *KEL*02* alleles) associated with c.575G>C transversion (p.Arg192Pro). Such an unusual KEL1 expression encoded by a variant allele with c.578C has already been reported in *KEL*01.2* allele (KEL1-Ser193).²³ These data agree with the hypothesis that anti-KEL1 binds an epitope dependent on the conformation of the KEL glycoprotein.⁴ Whether KEL2 reactivity is affected by Pro192 remains unknown because of the presence of a conventional *KEL*02* allele in *trans* to *KEL*02M.15*. Finally, Sample 6 showed a polymorphism compatible with p.Gly263Glu amino acid change in *KEL*02* background (*KEL*02M.16* allele). Gly263 occupies a position at which dihedral angle (psi-phi) values cannot be satisfied by any other amino acid resulting in a significant conservation constraint. Indeed, replacement of Gly263 by Arg in KEL protein encoded by *KEL*02M.10* was shown to dramatically weaken KEL2 antigen expression²⁹ and similar effect could be considered with *KEL*02M.16* allele. According to the high conservation of Gly263 in M13 metalloproteases with G2-H2 loops of similar length, the SIFT algorithm also predicts mutations at this position as deleterious.

Today, no data are available concerning anti-KEL2 immunization in patients with *Kmod* phenotype or that are able to determine whether the few KEL molecules expressed by *Kmod* blood donors are able to induce alloimmunization in a recipient. However, serologic KEL2-negative results should always be confirmed by means of genotyping analysis to avoid transfusion of *Kmod* RBCs units into *KEL*:1,-2 recipients as previously suggested.¹⁸ Our data describing four new *KEL*01M* alleles suggest a nonnegligible incidence of KEL1 variants. Thus, routine serologic KEL1 typing should employ very sensitive antisera and technologies. Moreover, any ambiguity implying either KEL1 or KEL2 in donors should be confirmed by genotyping techniques; discrepancies between these methods may unveil the presence of *Kmod* or *K₀* phenotypes.

ACKNOWLEDGMENT


We thank E. Durieux-Roussel for providing phenotype data.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Daniels G, editor. Human blood groups. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.

2. Pal M, Williams B. Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: a population study from Queensland, Australia. *Pathology* 2015;47:151-5.
3. Russo D, Redman C, Lee S. Association of XK and Kell blood group proteins. *J Biol Chem* 1998;273:13950-6.
4. Clapéron A, Rose C, Gane P, et al. The Kell protein of the common K2 phenotype is a catalytically active metalloprotease, whereas the rare Kell K1 antigen is inactive. Identification of novel substrates for the Kell protein. *J Biol Chem* 2005;280:21272-83.
5. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigens factsbook. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012.
6. Russo DC, Lee S, Reid ME, et al. Point mutations causing the McLeod phenotype. *Transfusion* 2002;42:287-93.
7. Yazdanbakhsh K, Lee S, Yu Q, et al. Identification of a defect in the intracellular trafficking of a Kell blood group variant. *Blood* 1999;94:310-8.
8. Körmöczí GE, Scharberg EA, Gassner C. A novel KEL*1,3 allele with weak Kell antigen expression confirming the cis-modifier effect of KEL3. *Transfusion* 2009;49:733-9.
9. Lee S, Russo DC, Reid ME, et al. Mutations that diminish expression of Kell surface protein and lead to the Kmod RBC phenotype. *Transfusion* 2003;43:1121-5.
10. Lee S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. *Transfusion* 2007;47:32S-9S.
11. Körmöczí GE, Wagner T, Jungbauer C, et al. Genetic diversity of KELnull and KELel: a nationwide Austrian survey. *Transfusion* 2007;47:703-14.
12. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015;10:845-58.
13. Schulz H, Dale GE, Karimi-Nejad Y, et al. Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 2009;385:178-87.
14. Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:291-325.
15. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605-12.
16. Martin-Blanc S, Simon P, Gien D, et al. Identification of novel silent KEL alleles causing KEL:-5 (Ko) phenotype or discordance between KEL:1,-2 phenotype/KEL*01/02 genotype. *Transfusion* 2013;53:2859-66.
17. Lomas-Francis C, Vege S, Velliquette RW, et al. Expansion of the Kell blood group system: two new high-prevalence antigens and two novel K0 (Kellnull) phenotypes. *Transfusion* 2013;53:2887-91.
18. Matteocci A, Mancuso T, Moschetti A, et al. Three missense mutations found in the KEL gene lead to Kmod or K0 red blood cell phenotypes. *Transfusion* 2014;54:3216-21.
19. Polin H, Gaszner W, Suessner S, et al. Identification of a novel Kmod -1 allele encoded by 977C>T (Pro326Leu). *Transfusion* 2014;54:2130-1.
20. Moulds JM, Persa R, Riersen D, et al. Three novel alleles in the Kell blood group system resulting in the Knull phenotype and the first in a Native American. *Transfusion* 2013;53:2867-71.
21. Karamatic Crew V, Poole J, Burton N, et al. Three uncommon KEL alleles in one family with unusual Kell phenotypes explain a 35-year old conundrum. *Vox Sang* 2014;106:242-7.
22. Ji Y, Veldhuisen B, Ligthart P, et al. Novel alleles at the Kell blood group locus that lead to Kell variant phenotype in the Dutch population. *Transfusion* 2015;55:413-21.
23. Poole J, Warke N, Hustinx H, et al. A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL1 antigen. *Transfusion* 2006;46:1879-85.
24. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009;4:1073-81.
25. de Coulgeans CD, Silvy M, Halverson G, et al. Synonymous nucleotide polymorphisms influence Dombrock blood group protein expression in K562 cells. *Br J Haematol* 2014;164:131-41.
26. Kudla G, Murray AW, Tollervey D, et al. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* 2009;324:255-8.
27. Komar AA, Lesnik T, Reiss C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett* 1999;462:387-91.
28. Komar AA. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem Sci* 2009;34:16-24.
29. Wester ES, Steffensen R, Ligthart PC, et al. KEL*02 alleles with alterations in and around exon 8 in individuals with apparent KEL:1,-2 phenotypes. *Vox Sang* 2010;99:150-7. 

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Table S1. Primers used for PCR amplification of the 19 exons of *KEL* gene.

Fig. S1. Effect of side chains substitutions.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée.

DE BOISGROLIER Lugdivine

01/12/2017

RÉSUMÉ

Plus de 300 antigènes de groupes sanguins sont actuellement décrits. Ils sont d'expression variable en fonction des populations, ainsi que d'un individu à l'autre au sein d'une même population. L'existence de variants dans certains systèmes (RH ou KEL par exemple), et les phénotypes rares (notamment l'absence d'expression d'antigènes de fréquence élevée) peuvent être à l'origine de conflits immunologiques qui compliquent les transfusions ou les grossesses. Les variants antigéniques et les phénotypes rares ne sont, la plupart du temps, pas détectables par immuno-phénotypage, et seule la réalisation d'un génotype permet de les identifier.

La première partie de ce travail porte sur l'étude des ambiguïtés de phénotype des systèmes RH et Kell, particulièrement immunogènes. Le génotypage du système RH permet d'identifier les patients exprimant un phénotype partiel associé à un risque d'allo-immunisation. Si 60% des patients de phénotype RhD faible ne sont pas à risque d'immunisation et peuvent recevoir des produits sanguins RhD positif, près de 40% des patients avec une ambiguïté du phénotype RhC présentent un risque d'allo-immunisation anti-RhC. Nous nous sommes attachés, pour l'ensemble des ambiguïtés de phénotype, à poursuivre nos investigations jusqu'à l'identification d'un allèle pouvant expliquer l'ambiguïté. Ceci a permis d'identifier 16 nouveaux allèles *RH* et six nouveaux allèles *KEL*. Les données moléculaires ont été complétées par des analyses en cytométrie de flux, en immunohématologie ou grâce à la modélisation 3D.

La seconde partie de cette étude est la mise en place d'outils moléculaires pour prédire les phénotypes rares Vel-négatif ou Yta-négatif. Je me suis intéressée au phénotype Vel-négatif en raison de la dangerosité des immunisations anti-Vel. Bien que l'anti-Yt^a ne soit pas responsable, en général, de réactions transfusionnelles, son identification reste importante afin d'exclure la présence d'autres anticorps qui pourraient être dangereux.

Les résultats montrent la puissance des outils moléculaires pour décrire de nouveaux variants et améliorer la sécurité transfusionnelle des patients. Cependant les données moléculaires doivent toujours être corrélées aux données immunologiques et l'utilisation des outils moléculaires doit être élargie aux donneurs afin de disposer d'unités de sang compatibles avec le patient.

MOTS-CLÉS : groupes sanguins, génotypage, variants RH, phénotypes rares, sécurité transfusionnelle.